



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

COLONIZAÇÃO NASAL POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS: UM PROBLEMA?

Trabalho submetido por
João Pedro Teixeira Aguiar
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2013



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

COLONIZAÇÃO NASAL POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS EM ESTUDANTES UNIVERSITÁRIOS: UM PROBLEMA?

Trabalho submetido por
João Pedro Teixeira Aguiar
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professora Doutora Patrícia Cavaco Silva

outubro de 2013

Aos pais, irmão e restante família

Vós que caminhais a meu lado neste percurso que é a vida.

“Research is to see what everybody else has seen, and to think what nobody else has thought”

Albert Szent-Gyorgyi

Agradecimentos

*É chegado o momento de mostrar o meu reconhecimento e gratidão às pessoas que estiveram envolvidas nesta minha longa jornada. O primeiro e mais importante é feito à **Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva**, não só pela orientação e apoio prestados no desenvolvimento deste projeto, mas também por todas as oportunidades que me concedeu ao longo destes dois anos de trabalho juntos. Agradeço, ainda, aos **alunos participantes** porque sem eles este trabalho não tinha sido possível.*

*À **Prof. Doutora Filipa Alves da Costa**, agradeço todo o conhecimento que me transmitiu e todas as oportunidades concedidas, não só no âmbito da Iniciação à Investigação Científica, mas também em outras atividades realizadas conjuntamente com a Prof. Doutora Patrícia Cavaco Silva. À **Prof. Inês Cavaleiro**, também, agradeço todo o apoio prestado durante a realização deste projeto.*

*Aos meus colegas e amigos **Alexandre Rego, Ana Luísa Barroco, Ana Rita Rodrigues, Ana Sofia Figueiredo, Joana Lourenço, Kelly Frade, Mariana Antunes, Sara Fernandes, Sílvia Martins, Sofia Silva, Tânia Martins e Zahra Kará**, agradeço este percurso árduo e trabalhoso do qual frutou a nossa amizade e que perdurará para além dos cinco anos que nos uniu. Agradeço, ainda, à **Paula Brejo** pela amizade, por todo o apoio moral e por todo o conhecimento que me transmitiu nos últimos meses.*

*Aos meus grandes amigos **Ana Raquel Queiroz, Guilherme Coutinho, Filipe Fraga e Joana Lima**, agradeço a vossa amizade, paciência e apoio que foram essenciais para completar mais uma etapa da minha vida.*

*O último e um dos mais importantes é feito aos meus pais, **João e Adelaide**, ao meu irmão, **Bruno**, e restantes familiares. Agradeço-vos por todo o apoio, paciência, incentivo e amor que me concederam ao longo destes cinco anos da minha vida académica.*

A todos, o meu Muito Obrigado!

Um Bem-haja a todos vós!

João Pedro Teixeira Aguiar

Outubro de 2013

Resumo

Introdução: *Staphylococcus aureus* é uma bactéria colonizadora em portadores sãos, nomeadamente, das fossas nasais anteriores, podendo, em determinadas condições, desenvolver infeções. Em Portugal, estudos sobre esta temática, em instituições universitárias, são escassos.

Metodologia: Realizou-se um estudo observacional transversal, em que as amostras biológicas foram obtidas dos alunos do MICEF. Os isolados bacterianos foram identificados pelo teste da coagulase em tubo, *API*[®] *Staph* e PCR em tempo real (qPCR). Em relação aos *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), foram identificados pelos seguintes testes: teste de *screening* em meio de oxacilina, teste de difusão dos discos de oxacilina e cefoxitina, meio de *MRSA ID* e qPCR. Adicionalmente, pesquisou-se o gene *lukS-lukF* por qPCR e realizaram-se testes de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os resultados obtidos foram tratados com recurso aos programas *IBM SPSS* v. 20,0 e *Rotor Gene* v. 6.1.93.

Resultados: Obteve-se uma amostra de 25 alunos portadores de *S. aureus* e, apenas, um deles apresentava MRSA. Assim, estimou-se uma prevalência de colonização nasal por *S. aureus* e MRSA de 24,04% (25/104) e 0,96% (1/104), respetivamente. Nenhuma das estirpes apresentava o gene que codifica para a PVL. Verificou-se, ainda, que a maioria dos isolados foram sensíveis à maioria dos antibióticos testados, tendo-se registado uma elevada taxa de resistência à penicilina G (79,2%; n = 19) e uma taxa moderada à gentamicina (20,8%; n = 5), eritromicina (20,8%; n = 5) e cotrimoxazol (16,7%; n = 4). É de notar que se obtiveram 2 isolados bacterianos classificados como sendo multirresistentes aos antibióticos.

Conclusão: Verificou-se que a prevalência de colonização nasal, por *S. aureus* e MRSA, na população estudada, se encontra de acordo com os dados da literatura. Contudo, é de extrema importância monitorizar este fenómeno, dada a possibilidade de disseminação deste patógeno em instituições de ensino, além do risco de desenvolver doença no portador são.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*; MRSA; PVL; Colonização nasal.

Abstract

Background: *Staphylococcus aureus* is a typical colonizer in healthy carriers, namely of the anterior nares, and can develop infections in certain conditions. In Portugal, information addressing this issue in universities is still not well known, due to the paucity of studies.

Methods: A cross-sectional study was conducted and samples from anterior nares were obtained from pharmacy students. The isolates were identified using coagulase test, *API*[®] *Staph* and real-time PCR (qPCR). Methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) isolates were identified, as well, using Oxacilin screening agar, oxacilin and ceftiofur disk diffusion assay, *MRSA ID* agar and qPCR. The presence of PVL gene was assessed by qPCR and antimicrobial susceptibility testing was also performed. Results were analyzed using *IBM SPSS* v. 20,0 and *Rotor Gene* v. 6.1.93.

Results: A sample of 25 *S. aureus* carriers were obtained and only one of them was a MRSA. Therefore, the nasal carriage prevalence of *S. aureus* and MRSA were 24,04% (25/104) and 0,96% (1/104), respectively. Additionally, none of the isolates presented the PVL gene. Finally, low resistance was found for the majority of the antibiotics, with the exception of penicillin G (79,2%; n = 19), gentamicin (20,8%; n = 5), erythromycin (20,8%; n = 5) and co-trimoxazole (16,7%; n = 4). It is noteworthy that two bacterial isolates were classified as multiresistant to antibiotics.

Conclusion: It was found that the prevalence of nasal colonization by *S. aureus* and MRSA in our population is according to the literature. However, it is very important to screen this phenomenon, due to the possibility of spread of this pathogen in educational institutions, beyond the risk of developing disease in the healthy carrier.

Key-words: *Staphylococcus aureus*; MRSA; PVL; Nasal carriage.

Índice Geral

Índice de Figuras	15
Índice de Tabelas	17
Lista de Abreviaturas	19
Capítulo 1 – Introdução	21
1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
1.1.1. Caracterização geral	21
1.1.2. Colonização	23
1.1.3. Fatores de Virulência	27
1.1.4. Infecções ou Síndromes causados por <i>S. aureus</i>	30
1.2. História da emergência de resistências do <i>S. aureus</i> aos antibióticos	32
1.2.1. Resistência à Penicilina	32
1.2.2. Resistência à Meticilina	33
1.2.3. Resistência à Vancomicina	35
1.3. <i>S. aureus</i> Resistentes à Meticilina (MRSA)	37
1.3.1. Classificação	37
1.3.2. Epidemiologia	38
1.3.2.1. Métodos de Tipagem para <i>S. aureus</i>	38
1.3.2.2. <i>Staphylococcal Cassette Chromosome mec</i> (SCCmec)	39
1.3.2.3. MRSA adquiridos a nível hospitalar (HA-MRSA)	40
1.3.2.4. MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA)	41
1.3.2.5. Diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA	44
1.3.3. Colonização	44
1.4. Diagnóstico Laboratorial	45
1.4.1. Exame direto	45
1.4.2. Métodos Culturais	45
1.4.3. Métodos imunológicos	46
1.4.4. Testes Bioquímicos	46
1.4.5. Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) e Fagotipagem	47
1.4.6. Testes de Biologia Molecular	47
1.4.7. Testes rápidos de rastreio de infeção por MRSA	48
1.5. Terapêutica Antibiótica	49

1.5.1. Infecção por MSSA	49
1.5.2. Infecção por MRSA	49
1.6. Contextualização do Tema	50
Capítulo 2 – Objetivos e Questões para Investigação	53
2.1. Objetivos do Estudo	53
2.2. Questões para Investigação	53
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	55
3.1. Desenho do Estudo	55
3.2. População e Amostra	55
3.2.1. População	55
3.2.2. Critérios de Elegibilidade	55
3.2.2.1. Critérios de Inclusão	55
3.2.2.2. Critérios de Exclusão	55
3.2.3. Amostra	55
3.3. Recolha de Informação	56
3.3.1. Isolados bacterianos	56
3.3.2. Identificação do <i>S. aureus</i>	57
3.3.3. Identificação do <i>S. aureus</i> Resistentes à Meticilina (MRSA)	57
3.3.4. PCR em Tempo Real (qPCR)	58
3.3.5. Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA)	62
3.3.6. Determinação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos Métodos de Identificação utilizados	63
3.4. Ética e Confidencialidade	64
3.5. Análise dos dados	64
Capítulo 4 – Resultados e Discussão	67
4.1. Caracterização Sociodemográfica da Amostra	67
4.2. Caracterização da prevalência de <i>S. aureus</i> na população estudada	68
4.3. Caracterização da prevalência de <i>S. aureus</i> Resistentes à Meticilina (MRSA) ...	73
4.4. Estudo da presença do gene que codifica a <i>Panton-Valentine Leukocidin</i> (PVL) nos isolados de MSSA e MRSA	74
4.5. Estudo do perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos	76
4.6. Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos vários métodos de identificação utilizados	79
4.6.1. Identificação de <i>S. aureus</i>	79

4.6.2. Identificação de MRSA.....	81
4.7. Limitações do Estudo.....	85
4.8. Pontos fortes do Estudo realizado.....	85
4.9. Perspetivas Futuras	86
Capítulo 5 – Conclusões	87
Bibliografia.....	89
Anexo I – Declaração de Consentimento Informado	
Anexo II – Questionário	
Anexo III – Protocolo de <i>API® Staph</i>	
Anexo IV – Protocolo do Teste de <i>screening</i> em meio de oxacilina	
Anexo V – Protocolo de Extração: RTP® Bacteria DNA Mini Kit	
Anexo VI – Protocolo de Electroforese em gel de Agarose a 1%	
Anexo VII – Protocolo de Determinação da CMI para a vancomicina	

Índice de Figuras

Figura 1 - Observação ao microscópio ótico da disposição do <i>S. aureus</i> após coloração de Gram	21
Figura 2 - A: Coloração amarela das colónias em gelose simples; B: β -hemólise do <i>S. aureus</i> em gelose de sangue.....	22
Figura 3 - Taxa de colonização por <i>S. aureus</i> em diferentes locais do corpo em adultos	23
Figura 4 - Variação da taxa de colonização nasal ao longo dos anos.....	26
Figura 5 - Exemplos de fatores de virulência do <i>S. aureus</i>	27
Figura 6 - Mecanismo de ação da toxina PVL	30
Figura 7 - Mecanismo de ação e de regulação da síntese de β -Lactamases	33
Figura 8 - Mecanismo de ação da PBP2a	34
Figura 9 - Mecanismo de resistência de estipes VISA	36
Figura 10 - Classificação dos MRSA	38
Figura 11 - Prevalência de HA-MRSA no Mundo e com especial referência a Portugal	40
Figura 12 - Infecções causadas por CA-MRSA	43
Figura 13 - <i>MRSA ID</i>	48
Figura 14 - Fotografias do gel de electroforese após exposição à radiação UV	59
Figura 15 - Doenças do TRS apresentadas pelos portadores de <i>S. aureus</i>	69
Figura 16 - UPCS frequentadas pelos alunos nos últimos 6 meses.....	71
Figura 17 - Antibioterapia utilizada pelos portadores de <i>S. aureus</i>	72
Figura 18 - Curva padrão de otimização do ensaio para o gene <i>lukS-lukF</i>	74
Figura 19 - Curva de Melt do gene PVL	75
Figura 20 - Suscetibilidade aos antibióticos – Teste de Kirby-Bauer	77
Figura 21 - Curva padrão de otimização do ensaio para o gene <i>nuc</i>	79
Figura 22 - Curva de Melt do gene <i>nuc</i>	80
Figura 23 - Coloração característica das colónias de MRSA em MRSA ID	82
Figura 24 - Resultados do teste de suscetibilidade à oxacilina e cefoxitina.....	82
Figura 25 - Curva padrão de otimização do ensaio para o gene <i>mecA</i>	83
Figura 26 - Curva de Melt do gene <i>mecA</i>	84

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Principais diferenças entre os tipos de colonização	25
Tabela 2 - Exemplos de enzimas e toxinas produzidas pelo <i>S. aureus</i>	28
Tabela 3 - Testes de tipagem utilizados para <i>S. aureus</i>	39
Tabela 4 - Principais clones de HA-MRSA.....	41
Tabela 5 - Principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA	44
Tabela 6 – Antibioterapia recomendada para as infeções por MSSA	49
Tabela 7 - Antibioterapia recomendada para as infeções por MRSA	50
Tabela 8 - Questionário para recolha de informação sociodemográfica e clínica.....	56
Tabela 9 - Perfil fenotípico para identificação de <i>S. aureus</i>	57
Tabela 10 - Critérios utilizados para classificação do isolado bacteriano como MRSA.....	58
Tabela 11 - <i>Primers</i> utilizados no qPCR.....	60
Tabela 12 - Concentração ótima para cada par de <i>primers</i>	60
Tabela 13 - Controlos de qualidade utilizados nos ensaios efetuados para cada gene..	61
Tabela 14 - Antibióticos utilizados na realização dos TSA.....	62
Tabela 15 – Critérios de suscetibilidade e validação definidos pelo CLSI e EUCAST	62
Tabela 16 - Critérios de suscetibilidade e validação da vancomicina	63
Tabela 17 - Distribuição da amostra por sexo	67
Tabela 18 - Associação entre a colonização nasal por <i>S. aureus</i> e o sexo do aluno.....	68
Tabela 19 - Presença de Doenças do Trato Respiratório Superior nos alunos portadores	69
Tabela 20 - Associação entre a colonização por <i>S. aureus</i> e a história de existência de doenças do TRS	70
Tabela 21 - Distribuição por exposição às UPCS nos últimos 6 meses	70
Tabela 22 - Distribuição pela utilização de antibioterapia nos últimos 2 meses.....	72
Tabela 23 - Associação entre a exposição à antibioterapia e a colonização nasal por <i>S. aureus</i>	73
Tabela 24 – Validação do ensaio do teste de difusão dos discos em gelose	76
Tabela 25 – Validação do ensaio para determinação da CMI da vancomicina	77
Tabela 26 – Isolados bacterianos multirresistentes aos antimicrobianos	78
Tabela 27 – Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos ensaios de identificação de <i>S. aureus</i>	80

Tabela 28 - Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos ensaios de identificação de MRSA utilizados	84
---	----

Lista de Abreviaturas¹

ATCC	– <i>American Type Culture Collection</i>
CA-MRSA	– <i>Community-acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
CDC	– <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	– <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	– Concentração Mínima Inibitória
C_T	– <i>Cycle Threshold</i>
DNA	– <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<i>E.coli</i>	– <i>Escherichia coli</i>
ECN	– Estafilococos Coagulase Negativos
EUA	– Estados Unidos da América
EUCAST	– <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Fc	– Fração contante da Imunoglobulina
HA-MRSA	– <i>Hospital-acquired Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
HBD2	– <i>Human Beta-Defensin 2</i>
HNP 1, 2 e 3	– <i>Human Neutrophil Peptide 1, 2 e 3</i>
hVISA	– <i>heterogeneous Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus</i>
IgA	– Imunoglobulina A
IgG	– Imunoglobulina G
ISCSEM	– Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz
Meio de TSA	– <i>Trypticase Soy Agar</i>
MICF	– Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MRSA	– <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	– <i>Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules</i>
MSSA	– <i>Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus</i>
PBP	– <i>Penicillin Binding Protein</i>
PCR	– <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PVL	– <i>Panton-Valentine Leukocidin</i>
qPCR	– <i>Real-time or quantitative Polymerase Chain Reaction</i>

¹ Para algumas abreviaturas foi mantida a nomenclatura anglo-saxónica dado o seu carácter universal, facilitando, assim, o seu reconhecimento.

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SCCmec – *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

SCV - *Small-Colony Variants*

TSA – Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSST-1 – *Toxic Shock Syndrome Toxin 1*

UCI – Unidade de Cuidados Intensivos

UFC/ml – Unidades Formadoras de Colónias por mililitro

UV – Ultravioleta

VISA – *Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*

VRSA – *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*

Capítulo 1 – Introdução

1.1. *Staphylococcus aureus*

1.1.1. Caracterização geral

O género *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e caracteriza-se pela sua morfologia de cocos de Gram-positivo com, aproximadamente, 0,5µm a 1,5 µm de diâmetro (Santos, Leal, Ferreira, Rodrigues, & Castro, 2007). São bactérias imóveis, não esporuladas e, maioritariamente, não encapsuladas, podendo apresentar-se de diversas formas: isoladas, aos pares, em cadeias curtas ou agrupadas em forma de cacho de uva (Figura 1). Dentro deste género, existem 33 espécies, sendo que, apenas, 17 são isoladas de amostras biológicas provenientes do organismo humano (Murray, Rosenthal & Pfanner, 2006; Santos *et al.*, 2007).

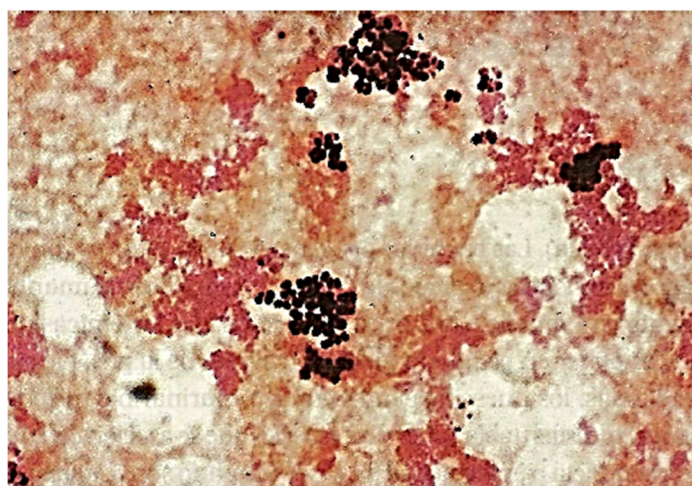


Figura 1 - Observação ao microscópio ótico da disposição do *S. aureus* após coloração de Gram
(retirado de Murray *et al.*, 2006)

A espécie com maior significado clínico é o *Staphylococcus aureus*, sendo associado a diversas infeções no ser humano, sobretudo em ambiente hospitalar. Apesar disso, atualmente, está também a ganhar reconhecimento a nível da comunidade. (Santos *et al.*, 2007). Esta bactéria foi identificada pela primeira vez em 1880, por *Sir Alexander Ogston*, como a principal causa de supuração de feridas cirúrgicas (Archer, 1998; Deurenberg *et al.*, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008). Atualmente, as infeções causadas por este microrganismo variam desde infeções limitadas à pele e tecidos moles até infeções sistémicas (*e.g.* osteomielite, endocardites e bacteriémias) (Gelatti & Becker, 2009).

Além disso, a severidade das infecções mencionadas está relacionada com o arsenal de fatores de virulência que este microrganismo consegue produzir como, por exemplo, proteases, enterotoxinas, toxinas pirogênicas, entre outros (Archer, 1998; Bartlett & Hulten, 2010; Santos *et al.*, 2007).

Em termos laboratoriais, o *S. aureus* cresce facilmente em meios simples, a um pH próximo da neutralidade e a uma temperatura de incubação de 37°C. As colônias apresentam-se arredondadas, lisas e brilhantes e a cor pode variar entre tons de cinzento e amarelo (Figura 2 - A) (Murray *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007). Em 1884, *Anton J. Rosenbach* conseguiu isolar este microrganismo, em meio de cultura sólido, observando a variação de cores mencionadas anteriormente e designando-o, em latim, de *aureus* (que significa dourado) (Gharibi, Mirzaei, Zakerhussaini, & Darabi, 2012). Quando isolado em gelose de sangue de carneiro, as suas colônias surgem com um halo de hemólise à volta, designando-se β -hemólise (Figura 2 – B) (Murray *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007).

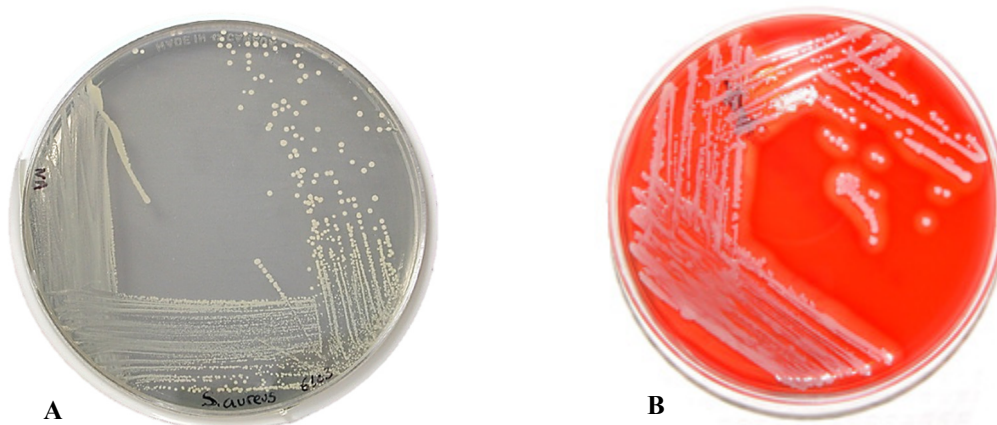


Figura 2 - A: Coloração amarela das colônias em gelose simples (Adaptado de Takeda, s.d.); **B:** β -hemólise do *S. aureus* em gelose de sangue (Adaptado de Academy of Pediatrics, 2013)

Desde meados de 1940, com o surgimento de estirpes resistentes à penicilina, este microrganismo tem dado provas de que a sua capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência é muito eficaz (Deurenberg *et al.*, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Gelatti & Becker, 2009). Atualmente, cerca de 80% dos isolados de *S. aureus* são resistentes a este antibiótico e tem-se tornado preocupante a emergência de estirpes resistentes à meticilina (MRSA) e intermédios à vancomicina (VISA), tanto em ambiente hospitalar como em ambulatório (Santos *et al.*, 2007).

1.1.2. Colonização

O *S. aureus* é uma bactéria com grande capacidade de resistir a ambientes hostis e, por isso, dissemina-se facilmente (Santos *et al.*, 2007). Um dos seus principais reservatórios é o organismo humano, podendo colonizar diversas partes do corpo (Gelatti & Becker, 2009; Santos *et al.*, 2007). O principal nicho deste patógeno, no organismo humano, são as fossas nasais anteriores, seguindo-se a pele (região perineal, vaginal, axilar, abdominal e mãos) e, em menor extensão, o intestino e garganta (Figura 3) (Gordon & Lowy, 2008; Wertheim *et al.*, 2005).

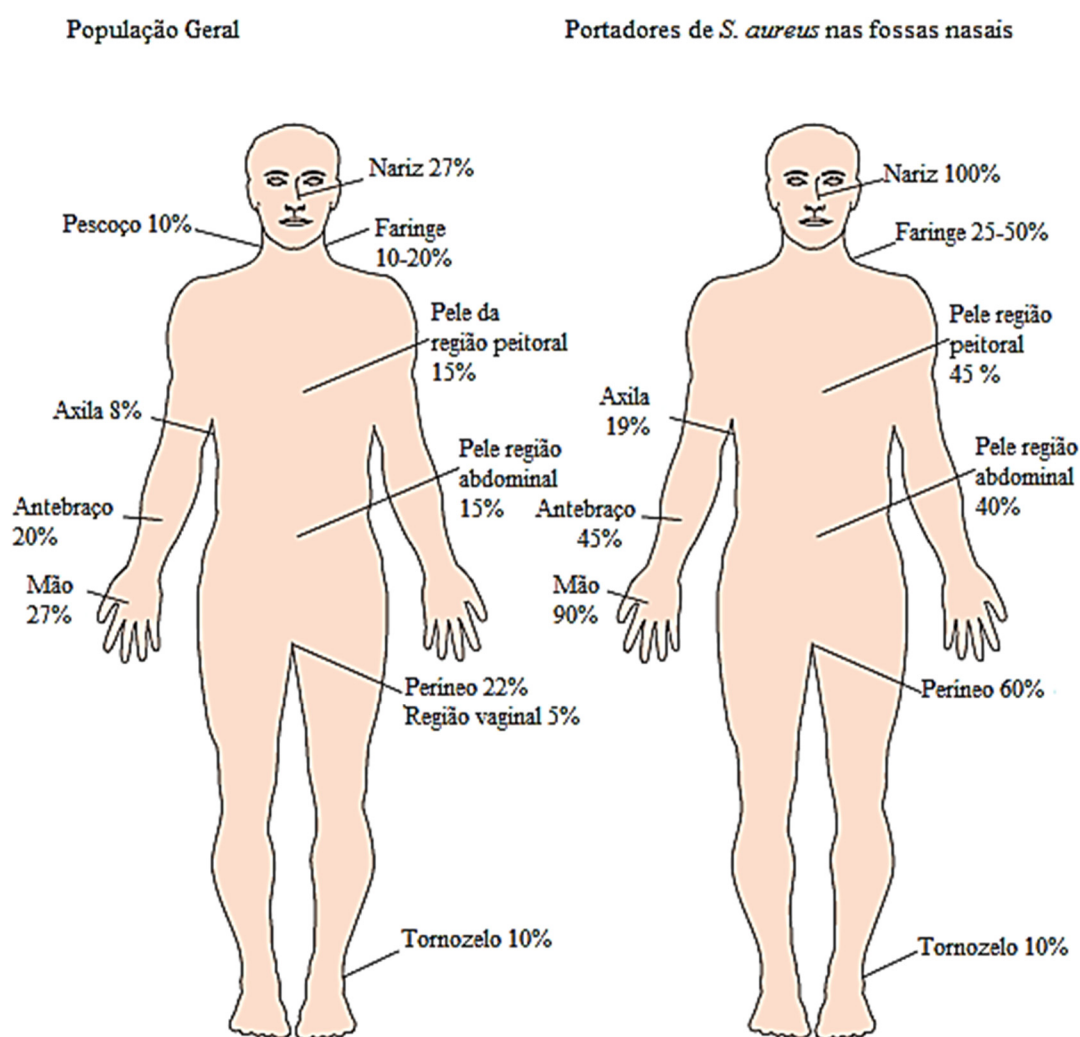


Figura 3 - Taxa de colonização por *S. aureus* em diferentes locais do corpo em adultos (Adaptado de Wertheim *et al.*, 2005)

As mãos assumem um papel crucial na transmissão deste microrganismo, estando a sua colonização bastante correlacionada com a colonização das fossas nasais. Os mecanismos que levam à colonização nasal por *S. aureus* são multifatoriais, não dependendo apenas

do seu potencial para se alojar no local mencionado, mas também das características do hospedeiro. A idade, a condição socioeconômica, o tamanho do agregado familiar, a etnia, o sexo, a hospitalização prévia, as atividades que provoquem lesões cutâneas e a exposição recente a antibioterapia são alguns exemplos de fatores que contribuem para este fenômeno (Wertheim *et al.*, 2005).

As secreções nasais são constituídas por componentes que contribuem para a resposta imunitária inata do nosso organismo, incluindo as IgA e IgG, lisozima, lactoferrina e péptidos antimicrobianos. Aquando da colonização nasal, o *S. aureus* é capaz de causar uma desregulação na resposta imunitária do nosso organismo, escapando assim à sua eliminação (Bien, Sokolova, & Bozko, 2011). Os estudos revelam que os portadores desta bactéria costumam apresentar sinais inflamatórios (α -defensinas – HNP (*Human Neutrophil Peptide*) 1, 2 e 3 – e HBD (*Human Beta-Defensin*) 2), derivados da presença de ácido lipoteicóico na parede celular da bactéria, estimulando, assim, a atividade e mobilização dos neutrófilos (Gordon & Lowy, 2008; Wertheim *et al.*, 2005). Além disso, a maioria das estirpes deste microrganismo são resistentes aos péptidos produzidos pelo nosso organismo (Wertheim *et al.*, 2005).

Durante muitos anos associou-se a colonização nasal por *Staphylococcus aureus* ao seu tropismo para a mucosa nasal, nomeadamente para as mucinas. Porém, estudos posteriores verificaram que esta bactéria se multiplicava independentemente na região do períneo. Tanto o último local, como o nariz, apresentam uma grande extensão de glândulas sudoríparas apócrinas, colocando-se assim a hipótese de este microrganismo ser capaz de se multiplicar nestas estruturas da pele (Wertheim *et al.*, 2005).

Normalmente, as pessoas colonizadas por *S. aureus* não apresentam sintomatologia, ou seja, não desenvolvem doença, sendo por isso designados como portadores sãos (Santos *et al.*, 2007). Em termos clínicos, este processo assume um importante papel na disseminação da bactéria a outras zonas do corpo e mesmo a outras pessoas (Gorwitz *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2007). A nível hospitalar, a sua disseminação pode dar-se através do próprio doente, familiar ou profissional de saúde, sendo de extrema importância monitorizar, este último, por forma a evitar surtos de infeções (Gorwitz *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2007; Wertheim *et al.*, 2005).

Estudos longitudinais têm verificado a existência de, pelo menos, três padrões de colonização em portadores sãos: colonização persistente, colonização intermitente e sem

colonização (Tabela 1) (Wertheim *et al.*, 2005). Estima-se que cerca de 20% dos indivíduos sejam portadores persistentes, 30% portadores intermitentes e 50% não portadores desta bactéria (Ammerlaan, Kluytmans, Wertheim, Nouwen, & Bonten, 2009; Gordon & Lowy, 2008; Wertheim *et al.*, 2005). Muitas vezes, o desenho de estudo implementado é transversal, não permitindo a correta distinção entre os portadores são persistentes e intermitentes, sendo bastante relevante este último facto, dado que os primeiros apresentam maior inóculo e, por isso, maior risco de posterior infeção. Além disso, alguns estudos colocaram a hipótese da colonização persistente estar relacionada com as glândulas sudoríparas apócrinas e a colonização intermitente com a mucosa nasal (mucinas) (Wertheim *et al.*, 2005).

Tabela 1 - Principais diferenças entre os tipos de colonização (Adaptado de Wertheim *et al.*, 2005)

Características	Colonização persistente	Colonização intermitente	Sem colonização
Prevalência	20%	30%	50%
Quantidade de inóculo	Elevada quantidade de microorganismo no local colonizado	Quantidade dependente da colonização vs. não colonização	Sem inóculo
Local colonizado	Glândulas sudoríparas apócrinas	Mucosa nasal (mucinas)	-
Estirpe colonizadora	Sempre a mesma estirpe ao longo do tempo	A estirpe colonizadora varia ao longo do tempo	Sem estirpe
Diagnóstico laboratorial	Uma colheita de cada fossa nasal anterior e posterior repetição do procedimento ao fim de uma semana	Pelo menos sete colheitas de cada fossa nasal para análise	Pelo menos sete colheitas de cada fossa nasal para análise
Implicações clínicas	Maior risco de infeção pela estirpe colonizadora	Risco moderado de infeção pela estirpe colonizadora	Sem risco de infeção pela estirpe colonizadora

Em termos laboratoriais não existe um consenso relativamente ao número de amostras que é necessário colher para que se possa classificar os portadores consoante os padrões apresentados. Sabe-se, apenas, que se deve colher uma amostra de cada narina e que se deve repetir o procedimento uma semana depois, para uma classificação mais precisa e correta. Relativamente aos portadores intermitentes, Wertheim *et al.* (2005) ressalva a necessidade de se colher, pelo menos, sete amostras para uma identificação precisa e distinção dos não portadores.

A Figura 4 demonstra que ao longo dos anos a taxa de colonização nasal tem vindo a diminuir, estando este facto relacionado com as melhores condições socioeconómicas e de higiene e a diminuição dos agregados familiares (Wertheim *et al.*, 2005).

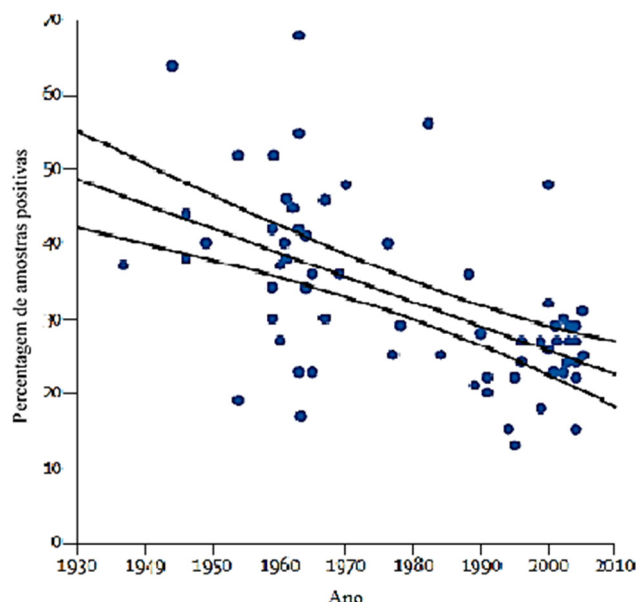


Figura 4 - Variação da taxa de colonização nasal ao longo dos anos (Adaptado de Wertheim *et al.*, 2005)

A colonização é fundamental para a patogénese da infeção causada pelo *S. aureus* e tem uma importante contribuição para a sua epidemiologia a nível hospitalar (Ammerlaan *et al.*, 2009). Em 1931, Danbolt foi o primeiro investigador a demonstrar que existia uma relação entre a colonização nasal por *S. aureus* e as infeções por ele causadas. Ao longo dos anos, estudos que têm sido realizados corroboram a descoberta feita pelo autor mencionado, verificando-se, em muitos deles, que a estirpe que coloniza uma determinada zona do organismo é a mesma que se isola das amostras biológicas colhidas (Wertheim *et al.*, 2005). Porém, a relação entre a colonização nasal e as suas implicações na comunidade ainda não é completamente conhecida. Torna-se, assim, importante investir em estudos que analisem como se dá a introdução e disseminação deste microrganismo na comunidade e quais os fatores que contribuem para tal (Miller *et al.*, 2009).

1.1.3. Fatores de Virulência

O arsenal de fatores de virulência existentes no *S. aureus* é extenso e inclui elementos estruturais e produtos de secreção (Figura 5). A produção destes compostos é regulada por um gene acessório, designado *agr*, e está dependente do estadio em que se encontra o processo infeccioso (Gordon & Lowy, 2008).

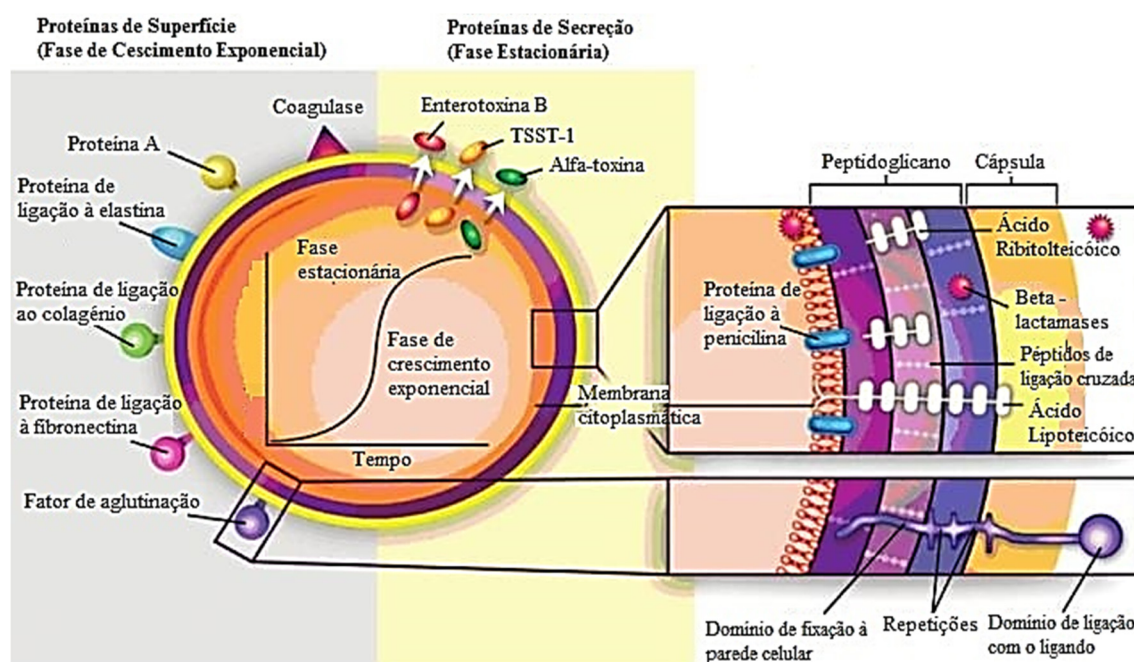


Figura 5 - Exemplos de fatores de virulência do *S. aureus* (Adaptado de Gordon & Lowy, 2008)

Durante a colonização, o *S. aureus* produz compostos proteicos da superfície celular, designados por *Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules* (MSCRAMM), sendo responsáveis pela sua aderência às células ou eventuais materiais prostéticos existentes no hospedeiro. As proteínas de ligação ao colágeno, fibronectina e elastina são exemplos de MSCRAMM e têm merecido um reconhecimento crescente na iniciação de infecções vasculares, do osso e articulações e de dispositivos prostéticos (Gordon & Lowy, 2008).

Este microrganismo é capaz de resistir à resposta imunitária do hospedeiro, através dos seguintes mecanismos:

- Promoção da opsonização do complemento: através de um dos MSCRAMM, a proteína A, que se liga a porção Fc das imunoglobulinas;

- Neutralização da fagocitose: através da microcápsula que envolve a bactéria (a maioria dos isolados clínicos apresenta microcápsulas do tipo 5 e 8);
- Inibição da resposta humoral e celular: através da secreção de proteínas inibidoras da quimiotaxia e/ou proteínas de aderência extracelular, que interferem com a extravasão e quimiotaxia dos neutrófilos para o local de infecção
- Formação de biofilmes ou *Small-Colony Variants* (SCV): estas estruturas baseiam-se na associação de várias colônias numa matriz de polissacáridos, conferindo proteção e resistência à antibioterapia (Archer, 1998; Bartlett & Hulten, 2010; Bien *et al.*, 2011; Gordon & Lowy, 2008; Santos *et al.*, 2007).

Aquando da infecção, esta bactéria é capaz de produzir enzimas e toxinas responsáveis pela invasão e destruição dos tecidos do hospedeiro e pela sua posterior disseminação para outros locais do organismo (Bien *et al.*, 2011). A Tabela 2 resume algumas das enzimas e toxinas com maior importância clínica.

Tabela 2 - Exemplos de enzimas e toxinas produzidas pelo *S. aureus* (Adaptado de Murray *et al.*, 2006)

<i>Classe</i>	<i>Designação</i>
Enzimas	Proteases
	Lipases
	Elastases
	Hialuronidase
	Coagulase
	β – Lactamase
	Catalase
	DNAse
Toxinas	α – toxina ou α – hemolisina
	β – toxina ou β – hemolisina
	δ – toxina ou δ – hemolisina
	γ – toxina ou γ - hemolisina
	PVL
	Exfoliatina
	TSST – 1
	Enterotoxinas (A, B, C, D e E)

No presente trabalho dar-se-á ênfase a um fator de virulência, em especial, a *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL). Esta toxina foi, inicialmente, designada *Substance Leukocidine* por *Van deVelde*, em 1894, dada a sua capacidade de lisar os leucócitos. Em 1932, *Panton* e *Valentine* foram os primeiros investigadores a descobrir a associação existente entre as infeções da pele e tecidos moles e a presença da exotoxina PVL nos isolados clínicos. A presença deste componente, no *S. aureus*, verificou-se primariamente nos isolados sensíveis à meticilina e, mais recentemente, nos isolados resistentes a esse antibiótico, demonstrando, por isso, que a descoberta deste fator de virulência remonta a uma época em que os MRSA, ainda, não constituíam um verdadeiro problema (Boyle-Vavra & Daum, 2007).

Em termos genéticos, o gene *lukS-lukF* localiza-se no profago Φ Sa2 e é transmitido por via horizontal. Estruturalmente, é composta por dois componentes (LukS-PV e LukF-PV), que se associam formando um poro, e tem um elevado tropismo para as membranas celulares dos leucócitos polimorfonucleares (*e.g.* neutrófilos, basófilos e eosinófilos). Ambos são secretados isoladamente e o primeiro a ligar-se à membrana dessas células é o LukS-PV, apesar do seu recetor ser ainda desconhecido. Este fenómeno favorece a ativação de uma proteína quinase (A ou C) no hospedeiro, havendo, deste modo, a fosforilação deste componente, seguido da indução dos canais de cálcio. Assim, gera-se uma cascata de reações que irão promover a produção de interleucinas e outros mediadores da inflamação. O componente LukF-PV é, posteriormente, libertado e intercala-se com o LukS-PV, formando dímeros que se associam e originam um heptâmero. Estando o poro formado, ocorre a libertação das interleucinas e outros mediadores da inflamação, que irão promover a lise das células. O tipo de dano na célula afetada está dependente da concentração de toxina que é libertada. Em concentrações elevadas (na ordem dos 200 nM), ocorre citólise, ao passo que em concentrações mais baixas (na ordem dos 5 nM), ocorre apoptose envolvendo, neste caso, a membrana da mitocôndria. Contudo, o seu efeito direto a nível da necrose ainda não está completamente esclarecido (Figura 6). É, ainda, importante salientar que esta toxina, ao contrário de muitas outras produzidas por este microrganismo, não é hemolítica (Abimanyu *et al.*,

2013; Berkthold *et al.*, 2012; Boyle-Vavra & Daum, 2007; Chambers & Deleo, 2010; David & Daum, 2010; Jahamy *et al.*, 2008; Lo & Wang, 2011; Otto, 2013).

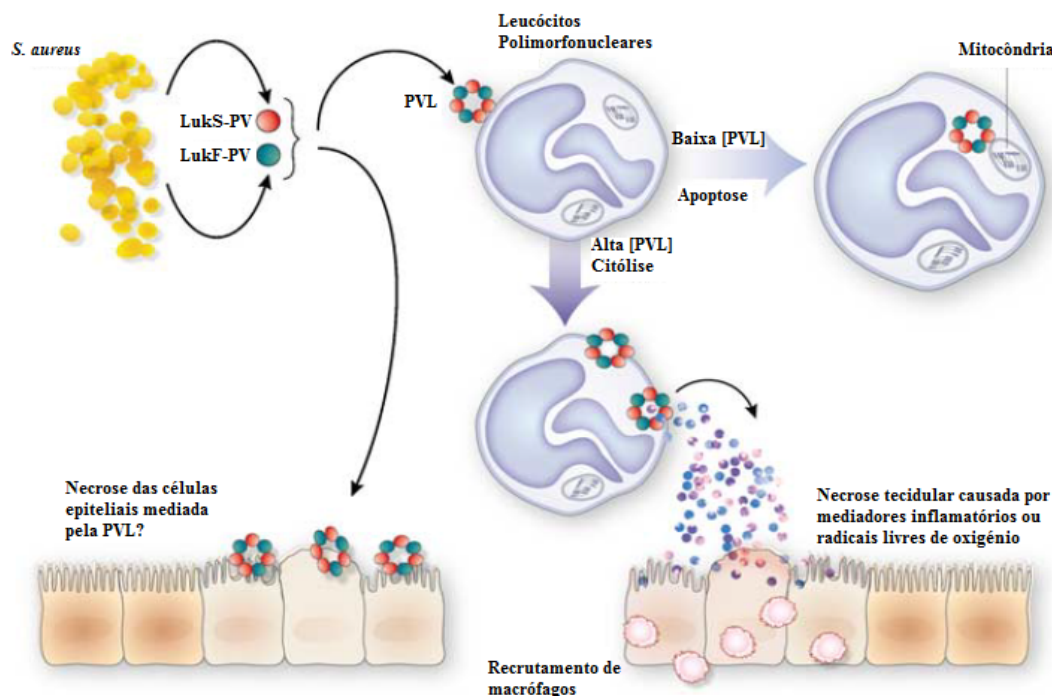


Figura 6 - Mecanismo de ação da toxina PVL (Adaptado de Boyle-Vavra & Daum, 2007)

1.1.4. Infecções ou Síndromes causados por *S. aureus*

As infecções causadas pelo *S. aureus* podem ser mediadas pela produção de toxinas ou pela invasão direta e destruição dos tecidos (Archer, 1998; Murray *et al.*, 2006). As manifestações clínicas de algumas infecções ou síndromes são causadas exclusivamente pela atividade das toxinas (*e.g.* síndrome da pele escaldada, intoxicação alimentar estafilocócica e síndrome do choque tóxico), enquanto outras são consequência da proliferação do microrganismo, dando lugar à formação de abscessos e à destruição tecidual (*e.g.* infecções cutâneas, endocardites, pneumonia, empiema, osteomielite e artrite séptica). Além disso, esta bactéria tem também o potencial de causar infecções em dispositivos prostéticos e infecções a partir de cateteres (Murray *et al.*, 2006).

Nesta secção serão apresentadas as infecções e/ou síndromes mais comuns causados por este microrganismo, sendo subdivididas em:

- a) Infecções mediadas por toxinas:

Síndrome da Pele Escaldada: foi pela primeira vez descrita em 1878, por *Gottfried Ritter von Rittershain*, designando-se também por doença de *Ritter*. Caracteriza-se pela descamação disseminada do epitélio em lactentes, havendo a formação de bolhas isentas de microrganismos e/ou leucócitos (Smith & Sandall, 2012).

Intoxicação Alimentar: é provocada pela ingestão de alimentos contaminados com toxinas termoestáveis (vulgarmente designadas enterotoxinas), provocando vômitos intensos, diarreia e cólicas. A resolução dos sintomas ocorre em cerca de 24 horas (Argudín, Mendoza, & Rodicio, 2010).

Síndrome do Choque Tóxico: é provocado pela TSST-1 e caracteriza-se pela falência multiorgânica, iniciando-se com um pico febril, hipotensão e exantemas maculoeritematosos. A mortalidade associada a esta síndrome é elevada, caso o doente não seja tratado de imediato com antibioterapia e caso não seja eliminado o foco de infeção (Lappin & Ferguson, 2009).

b) Infeções supurativas:

Impetigo: é uma infeção cutânea localizada que se caracteriza pela presença de vesículas contendo pus, sobre uma base eritematosa (Cole & Gazewood, 2007).

Foliculites: é uma infeção superficial do folículo piloso que pode ocorrer em qualquer zona da pele, sendo comum em zonas mais oleosas (Hsu & Hsu, 2012).

Furúnculos e Carbúnculos: os furúnculos caracterizam-se pela presença de nódulos contendo pus e são, geralmente, dolorosos. Os carbúnculos resultam da união de furúnculos e atingem geralmente o tecido subcutâneo, podendo causar uma infeção sistémica (febre, calafrios e bacteriémia) (Hsu & Hsu, 2012).

Bacteriémia e endocardites: a bacteriémia caracteriza-se pela presença de bactérias na corrente sanguínea, a partir de um foco infeccioso, e posterior disseminação para outros órgãos. A endocardite resulta de danos no revestimento endotelial do coração (Gould *et al.*, 2012; van Hal *et al.*, 2012).

Pneumonia e Empiema: a pneumonia é uma doença pulmonar inflamatória que pode ter origem bacteriana, havendo consolidação dos espaços aéreos presentes nos alvéolos. Em 10% dos casos de pneumonia bacteriana, pode estar associado empiema, que se caracteriza pela formação de abscessos em cavidades naturais. Observa-se em indivíduos

jovens, idosos e em doentes que tenham uma patologia respiratória de base (seja ela recente ou não) (Murray *et al.*, 2006).

Osteomielite: caracteriza-se pela destruição dos ossos (após colonização e desenvolvimento de resposta inflamatória), sobretudo a zona metafisária dos ossos longos (Johansen & Jensen, 2013).

Artrite séptica: caracteriza-se por eritema e dor na articulação com acumulação de material purulento no espaço articular (Mathews & Coakley, 2008).

c) Outras infeções:

Infeções de feridas: caracteriza-se pela presença de eritema e acumulação de pus (abcessos) no local de uma ferida traumática ou cirúrgica (Santos *et al.*, 2007).

Infeções de cateteres: caracteriza-se pela resposta inflamatória crónica do organismo à presença da bactéria e possível entrada do mesmo pelo dispositivo médico, originando uma bacteriémia (Santos *et al.*, 2007).

Infeções de próteses: caracteriza-se pela infeção crónica associada a dor e limitando a mobilidade do local afetado. Ocorre como consequência da colonização do material que compõe o dispositivo (Murray *et al.*, 2006).

1.2. História da emergência de resistências do *S. aureus* aos antibióticos

1.2.1. Resistência à Penicilina

Antes da era pré-antibiótica, as infeções causadas pelo *S. aureus*, especialmente a bacteriémia, eram mortais em 80% dos casos (Lowy, 2003). Em 1940, com a introdução do antibiótico penicilina, o prognóstico dos doentes com infeções estafilocócicas melhorou substancialmente, diminuindo assim a mortalidade associada. Porém, a partir de 1942, começaram a surgir estirpes de *S. aureus* resistentes à penicilina, produzindo uma enzima designada penicilinase. Este fator de resistência foi introduzido no genoma deste microrganismo através de um plasmídeo que contém outros genes de resistência aos antimicrobianos, e as primeiras estirpes surgiram a nível hospitalar com posterior disseminação à comunidade (Deurenberg *et al.*, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Dumitrescu *et al.*, 2010)

O gene responsável pela codificação das β -lactamases designa-se por *blaZ* e é regulado por dois genes: *blaR1* (antirepressor) e *blaI* (repressor). Quando exposta aos antibióticos

β -lactâmicos, o gene *blaZ* e os genes acessórios são ativados, permitindo a codificação das enzimas mencionadas que irão promover a hidrólise do anel β -lactâmico. Os genes *blaR1* e *blaI* codificam as proteínas BlaR1 e BlaI, sendo a primeira uma proteína transmembranar que se autocliva, produzindo um fragmento que irá inibir a atividade da proteína repressora BlaI (Figura 7) (Lowy, 2003).

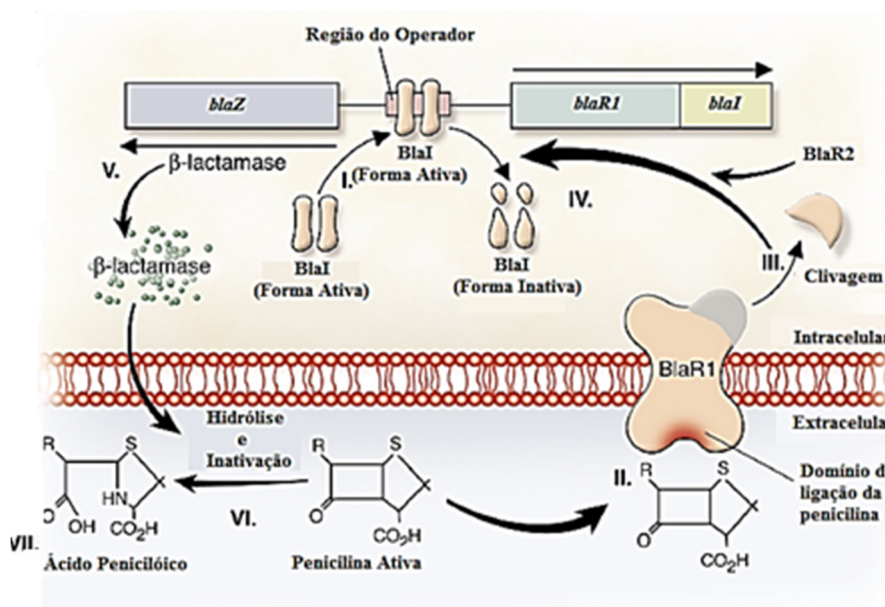


Figura 7 - Mecanismo de ação e de regulação da síntese de β -Lactamases (Adaptado de Lowy, 2003)

1.2.2. Resistência à Meticilina

O antibiótico meticilina foi introduzido, pela primeira vez, no mercado em 1959 e tem como mecanismo de ação a inibição da síntese da parede celular bacteriana. Esta molécula surgiu como resposta à elevada taxa de produção de β -lactamases, pelo *S. aureus*, visto que é resistente à ação dessas enzimas. Porém, em 1961, registou-se o surgimento da primeira estirpe de *S. aureus* resistente a esse antibiótico, tendo sido isolada num hospital britânico (Enright *et al.*, 2002; Gordon & Lowy, 2008). Assim, durante os anos 70, as estirpes resistentes à meticilina disseminaram-se para diversos países do Mundo (*e.g.* Austrália, Japão e EUA) e eram sobretudo isoladas em ambiente hospitalar, sendo, por isso, designadas como MRSA adquiridos a nível hospitalar (HA-MRSA). Contudo, desde 1998, estes patógenos têm-se tornado um problema emergente em ambulatório, designando-se como MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA) (Berkthold *et al.*, 2012; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Gordon & Lowy, 2008)

As proteínas de ligação às penicilinas (PBP) são essenciais à formação do peptidoglicano (composto necessário à formação da parede celular da bactéria) e têm uma elevada afinidade para os antibióticos β -lactâmicos, sendo estes últimos responsáveis pela inibição da sua atividade (Spratt, 2012). O gene responsável pela resistência à meticilina designa-se *mecA* e consiste num fragmento de DNA com 2.1 kb, que codifica para a proteína de ligação às penicilinas 2a (PBP2a) com 78 kDa. Este gene encontra-se num elemento móvel designado por *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCC*mec*) e é regulado pelo repressor MecI e pelo transdutor transmembranar de sinal de β -lactâmicos, MecRI. Assim, na presença de antibióticos β -lactâmicos, MecRI é clivado autocataliticamente e o domínio metalo-protease, que se encontra localizado no citoplasma, é ativado. Este domínio é capaz de clivar a proteína repressora (MecI) e, assim, o operador fica livre para que ocorra a transcrição do gene *mecA* e, consequentemente, a codificação da PBP2a. Esta proteína apresenta uma baixa afinidade de ligação aos antibióticos referidos e, por isso, estas estirpes são resistentes a todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo a classe das cefalosporinas (Figura 8) (David & Daum, 2010; Deurenberg *et al.*, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Dumitrescu *et al.*, 2010; Fuda *et al.*, 2004; Gordon & Lowy, 2008).

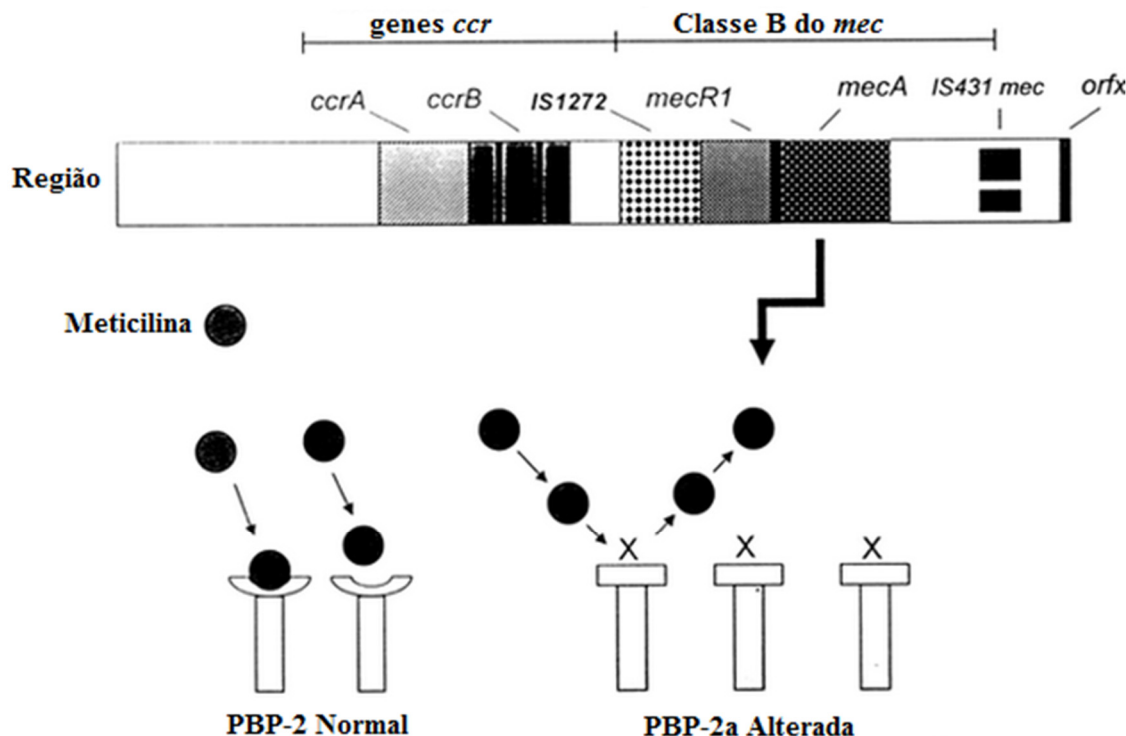


Figura 8 - Mecanismo de ação da PBP2a (Adaptado de Rybak & LaPlante, 2005)

Ao longo dos anos, inúmeros estudos têm sido realizados para se tentar perceber como terá o *S. aureus* adquirido este mecanismo de resistência à meticilina. Uma das hipóteses estabelecidas baseia-se na transferência horizontal da unidade móvel SCCmec a partir de uma espécie diferente, nomeadamente, a partir do *Staphylococcus sciuri*. Estudos demonstraram que a sequência de aminoácidos da PBP presente nessa espécie era 87,8% idêntica à PBP2a presente nos MRSA (Deurenberg *et al.*, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008).

1.2.3. Resistência à Vancomicina

A vancomicina é um antibiótico pertencente à classe dos Glicopéptidos e o seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese da parede celular bacteriana, através da sua atividade inibitória ao nível do peptidoglicano (Holmes, Johnson, & Howden, 2012; Howden, Davies, Johnson, Stinear, & Grayson, 2010). Esta molécula foi, pela primeira vez, introduzida no mercado em 1958, tendo-se registado o primeiro isolado resistente a este antibiótico em 1997, no Japão (Howden *et al.*, 2010; Kobayashi, Musser, & Deleo, 2012).

Os primeiros isolados bacterianos com suscetibilidade alterada foram classificados como *S. aureus* intermédios à vancomicina heterogéneos (hVISA), ou seja, fenotipicamente são sensíveis ao antibiótico em causa, mas existe uma subpopulação que é intermédia. Estudos sugerem que estes isolados bacterianos surgiram como resultado de uma série de mutações que ocorreram no seu genoma ao nível, por exemplo, dos genes *vraRS* e *graRS*, sendo estes essenciais à regulação do metabolismo da parede celular. A partir dos hVISA surgiram os VISA, sendo homogénea a suscetibilidade intermédia ao antibiótico nestas estirpes (Howden *et al.*, 2010). As alterações genéticas ao nível destas bactérias promove uma maior produção de peptidoglicano com uma quantidade significativa de resíduos de D-Ala-D-Ala e uma estrutura também diferente, com menor número de ligações cruzadas ao nível do peptidoglicano e, conseqüentemente, mais desorganizada. Assim, quando em contato com a vancomicina, estes resíduos de D-Ala-D-Ala ligam-se ao seu centro ativo, impedindo que o antibiótico atinja o seu local de ação – precursores da síntese de parede celular contendo resíduos de D-Ala-D-Ala (Figura 9) (Lowy, 2003).

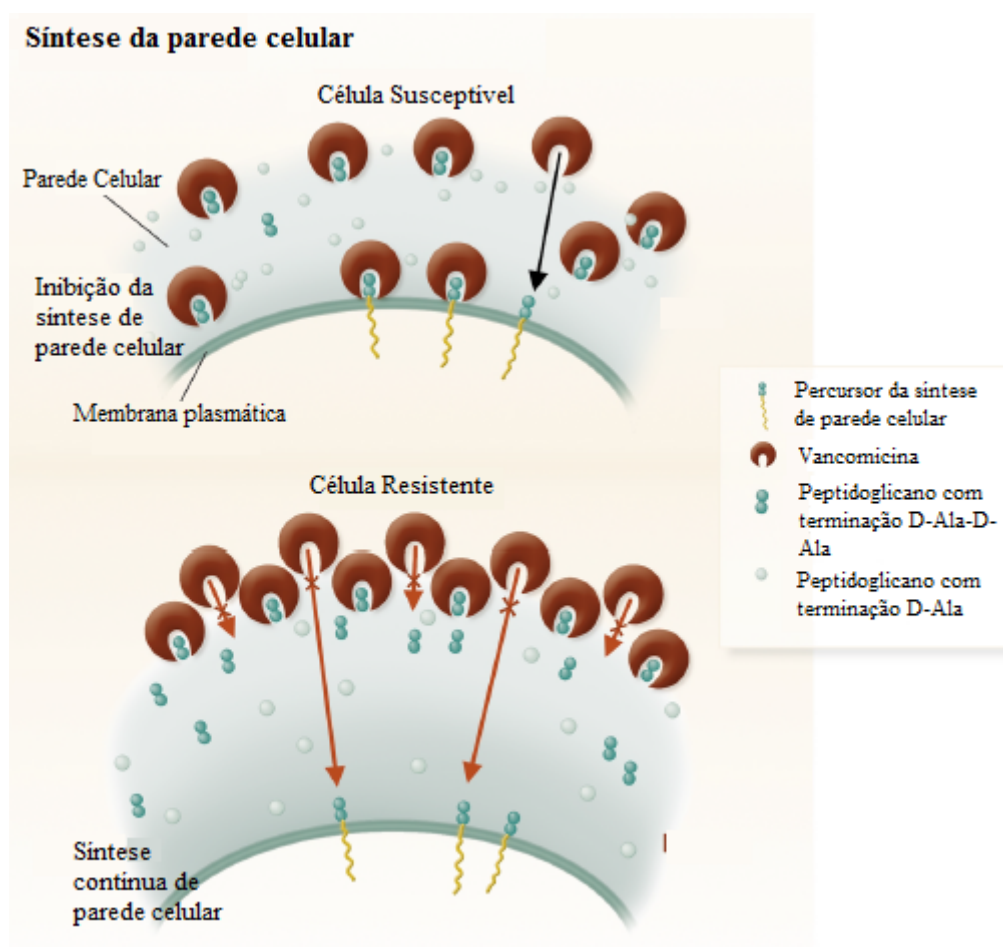


Figura 9 - Mecanismo de resistência de estipes VISA (Adaptado de Lowy, 2003)

A emergência crescente de MRSA, tanto a nível hospitalar como em ambatório, foi um fator crucial no desenvolvimento de resistências à vancomicina, dado que este antibiótico é utilizado no tratamento da maioria das infeções causadas por este patógeno (Bal et al., 2013). Apesar disso, a resistência demonstrada por esta espécie é ainda muito reduzida, comparativamente à resistência observada nos *Enterococcus* e ECN. Daí ainda não se terem isolado muitas estirpes de VRSA (Srinivasan, Dick, & Perl, 2002). Contudo, foi isolado, em 2013, o primeiro isolado de VRSA na Europa, nomeadamente, em Portugal (Melo-Cristino, Resina, Manuel, Lito, & Ramirez, 2013).

O gene responsável por esta resistência designa-se *vanA* e encontra-se no elemento genético móvel Tn 1546, que é transferido do género *Enterococcus* para a espécie *S. aureus* por transconjugação (Howden et al., 2010).

1.3. *S. aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA)

1.3.1. Classificação

Os termos HA-MRSA e CA-MRSA têm sido utilizados para definir as diferenças genótípicas existentes entre os isolados de MRSA, bem como as diferenças relativamente à epidemiologia e clínica das infeções que causam. Assim, para classificar de forma precisa estas estirpes, os estudos baseiam-se:

- a) No local onde a infeção por MRSA foi adquirida (Hospital Vs. Ambulatório);
- b) Na exposição vs. não exposição a unidades de cuidados de saúde (*e.g.* Hospitais e Centros de Saúde);
- c) Em fatores de risco que predis põem para a aquisição de MRSA;
- d) Nas características genéticas e suscetibilidade aos antimicrobianos;
- e) Na infeção ou síndrome desenvolvida pelo doente (David & Daum, 2010).

Os HA-MRSA são definidos como estirpes causadoras de infeção que ocorre passadas 48 horas de hospitalização ou que ocorram fora do *setting* hospitalar, num período de 12 meses, após exposição a unidades de prestação de cuidados de saúde (Anderson, 2013). História de hospitalização nos últimos 12 meses, cirurgia recente, hemodiálise, residência a longo-termo em unidades de cuidados continuados, presença de dispositivos médicos (*e.g.* cateteres, dispositivos percutâneos) no momento da cultura, isolados prévios de MRSA e terapêutica antibiótica prolongada são alguns dos fatores de risco que predis põem a infeções por HA-MRSA (Anderson, 2013; David & Daum, 2010; Huang *et al.*, 2006; Witte, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010).

Em 2000, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) definiu o termo CA-MRSA como qualquer estirpe que cause infeção na comunidade ou nas primeiras 48 horas após hospitalização, sem ter associados quaisquer fatores de risco descritos previamente (David & Daum, 2010). Contudo, esta definição foi alterada, havendo a exclusão do isolado prévio de MRSA como um fator de risco para HA-MRSA e definindo-se, assim, o CA-MRSA como qualquer estirpe que cause infeção tanto na comunidade como a nível hospitalar, sendo o isolado de MRSA obtido nas primeiras 48 horas após hospitalização (Anderson, 2013; David & Daum, 2010; Witte, 2009).

Com o passar dos anos, tem-se verificado uma emergente disseminação de estirpes de HA-MRSA na comunidade e de CA-MRSA a nível hospitalar, tornando-se, por vezes, difícil a sua distinção. Este fenómeno resultou da possibilidade dos indivíduos serem

colonizados num dos *settings* e desenvolverem a infeção noutro (Anderson, 2013; David & Daum, 2010; Huang *et al.*, 2006; Witte, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010). A Figura 10 resume a classificação de MRSA em HA-MRSA e CA-MRSA.

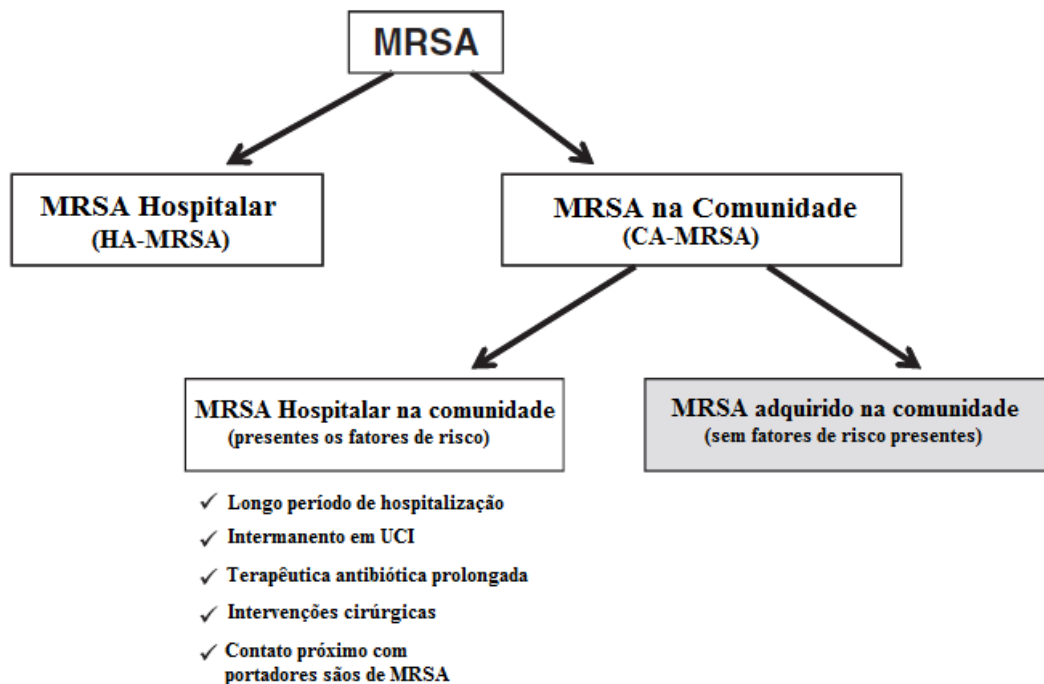


Figura 10 - Classificação dos MRSA (Adaptado de Witte, 2009)

1.3.2. Epidemiologia

Nas últimas décadas, as taxas de MRSA têm vindo a aumentar por todo o mundo (Stefani *et al.*, 2012). Assim, torna-se importante conhecer quais as características genéticas que as estirpes existentes atualmente apresentam e qual a sua suscetibilidade aos antibióticos para que se possa fazer a correta distinção entre uma estirpe de HA-MRSA e CA-MRSA (David & Daum, 2010).

1.3.2.1. Métodos de Tipagem para *S. aureus*

De forma a conhecer a epidemiologia e a desenvolver estratégias que permitam conter a disseminação das diversas estirpes, desenvolveram-se métodos moleculares de tipagem. Estes métodos incluem: *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *multilocus sequence typing* (MLST), *spa typing* e *SCCmec typing* (Deurenberg & Stobberingh, 2008). A Tabela 3 resume os alvos genéticos e as principais características dos métodos referidos.

Tabela 3 - Testes de tipagem utilizados para *S. aureus* (Adaptado de Stefani *et al.*, 2012)

<i>Testes de tipagem</i>	<i>Alvo genético</i>	<i>Características</i>
<i>Spa sequence typing</i>	Polimorfismo na região variável X do gene <i>spa</i>	Permite estudar tanto a evolução molecular da bactéria como os surtos hospitalares de MRSA
<i>Multilocus sequence typing</i>	Núcleo da população genética (7 genes <i>housekeeping</i>)	Método muito utilizado para estudar a evolução molecular do <i>S. aureus</i>
<i>SCCmec typing</i>	Elementos genéticos móveis	Permite a distinção, a nível molecular, entre HA-MRSA e CA-MRSA
<i>PFGE</i>	Restrição de polimorfismos no cromossoma	Elevado poder discriminatório; é o método <i>standard</i> para estudar os surtos de MRSA nos hospitais

1.3.2.2. *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec)

Como já referido na secção 1.2.2., o gene responsável pela resistência à meticilina (*mecA*), encontra-se numa unidade genética móvel designada SCCmec. Esta estrutura é constituída, essencialmente, por duas regiões: o complexo *mec* e o complexo de genes codificadores de recombinases (*ccr*) (Deurenberg *et al.*, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Dumitrescu *et al.*, 2010). Este último complexo, contém um par de genes, *ccrA* e *ccrB*, existindo até à data quatro formas alélicas (*ccrAB1-4*) e uma quinta exclusiva dos SCCmec V e VII, designado *ccrC*. É esta unidade a responsável pela mobilidade do SCCmec, visto ser nesta região que ocorrem fenómenos de integração e excisão da cassette (Dumitrescu *et al.*, 2010). Para além destas duas regiões, existe, ainda, uma terceira que comporta os elementos ditos acessórios como, por exemplo, as sequências de inserção, dos transposões ou as cópias de plasmídeos contendo genes de resistência não só aos β -lactâmicos, mas também a outras classes de antibióticos (Deurenberg *et al.*, 2007; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Dumitrescu *et al.*, 2010).

Existem oito tipos de SCCmec (I – VIII), cujo tamanho pode variar desde 20 a 66 kb (Dumitrescu *et al.*, 2010). Apesar disso, novas cassetes têm emergido com o passar dos anos (Ray, Gautam, & Singh, 2011). As cassetes do tipo II (53,0 kb) e III (66,9 kb) além da resistência aos β -lactâmicos contêm genes derivados de plasmídeos e transposões que

codificam para a resistência a outras classes de antibióticos como, por exemplo, tetraciclina e macrólidos (Deurenberg & Stobberingh, 2008). Ao contrário das anteriores, a cassette do tipo I (34,3 kb) apenas contém os genes responsáveis pela resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Relativamente às cassetes do tipo IV a VIII, tal como a cassette do tipo I, apenas contém genes de resistência aos β -lactâmicos (Carvalho, Mamizuka, & Filho, 2010; Deurenberg & Stobberingh, 2008; Dumitrescu *et al.*, 2010).

1.3.2.3. MRSA adquiridos a nível hospitalar (HA-MRSA)

Ao longo dos últimos anos tem sido registado um aumento da prevalência dos MRSA no *setting* hospitalar. As taxas mais elevadas (> 50%) têm sido reportadas na América do Sul e do Norte, Ásia e Malta. Dentro destes, a Ásia atinge os níveis de MRSA mais elevados, nomeadamente, na zona Este: Sri Lanka (86,5%), Coreia do Sul (77,6%), Vietname (74,1%), Taiwan (65,0%), Tailândia (57,0%) e Hong Kong (56,8%). Relativamente às taxas intermédias (25-50%), foram essencialmente reportadas na China, Austrália, África e alguns países europeus, (*e.g.* Portugal (49%), Grécia (40%), Itália (37%) e Roménia (34%)). Outros países Europeus como, por exemplo, os Países Baixos e Escandinávia apresentam baixa prevalência de MRSA, dada a baixa pressão de seleção causada pela utilização de antibioterapia e o elevado *screening* e descolonização de portadores são aquando da hospitalização (Figura 11) (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Stefani *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2010).

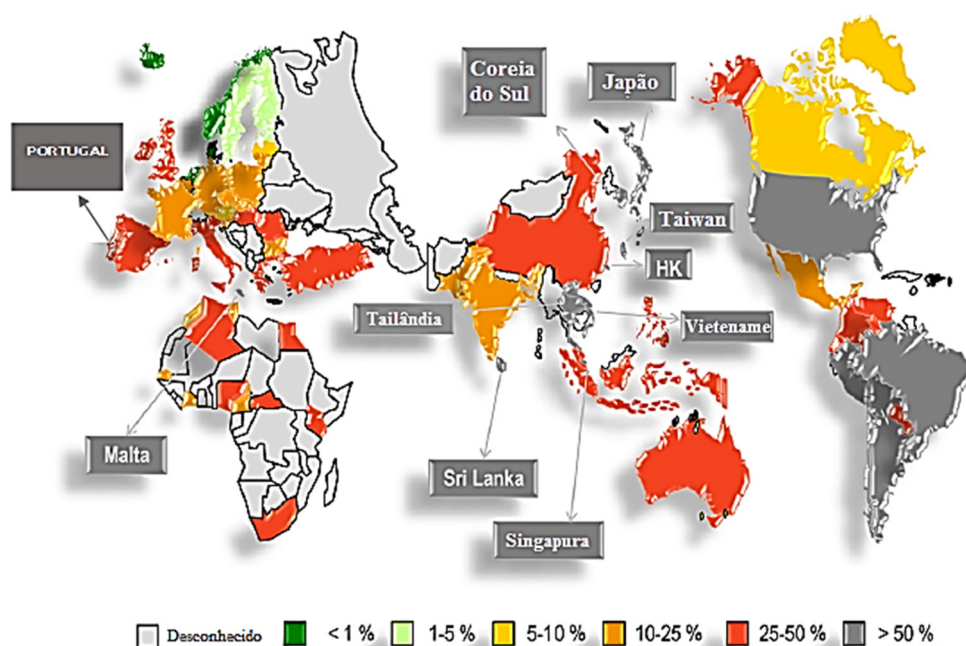


Figura 11 - Prevalência de HA-MRSA no Mundo e com especial referência a Portugal (Adaptado de Stefani *et al.*, 2012)

Normalmente, as estirpes de HA-MRSA apresentam o SCCmec do tipo I, II e III, sendo as duas últimas cassetes relacionadas com a multirresistência aos antimicrobianos, permitindo-lhes, assim, a sobrevivência num ambiente de elevada exposição a antibióticos. Além disso, estas bactérias têm demonstrado um elevado potencial patogénico, dada a sua capacidade de colonizar e disseminar-se através do ambiente ou de potenciais hospedeiros (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Gordon & Lowy, 2008).

A Tabela 4 resume os principais clones de HA-MRSA e o local e ano em que foram reportados pela primeira vez.

Tabela 4 - Principais clones de HA-MRSA (Adaptado de Stefani *et al.*, 2012 e Yamamoto *et al.*, 2010)

<i>Clones</i>	<i>Linhagem (ST)</i>	<i>Complexo Clonal (CC)</i>	<i>Local</i>	<i>Ano</i>
<i>Ibérico ou UK-MRSA-5</i>	ST247/SCCmecIA	CC8	Espanha	1989
<i>Nova Iorque/Japão</i>	ST5/SCCmecII	CC5	Estados Unidos	1998
<i>Brasileiro, Húngaro</i>	ST239/SCCmecIIIA e III	CC8	Brasil e Hungria	1992/3
<i>EMRSA-15</i>	ST22/SCCmecIV	CC22	Reino Unido	1993
<i>Pediátrico ou USA800</i>	ST5/SCCmec IV ou IVa	CC5	Portugal	1992

Em termos clínicos, os HA-MRSA podem ser isolados, por exemplo, de feridas cirúrgicas ou não cirúrgicas, bacteriémias, pneumonias associadas ao ventilador e infeções do trato urinário em doentes algaliados, sendo comuns em doentes com idade superior a 50 anos e em doentes imunocomprometidos (*e.g.* doentes com HIV) (Ray *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2010). Estas infeções consideradas nosocomiais, acarretam consequências como elevada mortalidade e custos em saúde, e tempo prolongado de internamento (Anderson, 2013).

1.3.2.4. MRSA adquiridos na comunidade (CA-MRSA)

A emergência crescente de estirpes de CA-MRSA, em todo o mundo, tem sido alvo de especial atenção, não só ao nível da comunidade, mas também a nível hospitalar. Esta bactéria foi, pela primeira vez, descrita, em 1993, na região oeste da Austrália, e, desde então tem-se vindo a disseminar por diversas regiões do globo (Deurenberg & Stobberingh, 2008; Köck *et al.*, 2010; Witte, 2009).

Os CA-MRSA são fenotípica e genotipicamente distintos dos HA-MRSA. As estirpes isoladas da comunidade apresentam, na maioria das vezes, as SCCmec do tipo IV e V, que lhes conferem resistência exclusivamente aos antibióticos β -lactâmicos, sendo

sensíveis à maioria das restantes classes de antibióticos. Além disso, é comum encontrar-se nestas estirpes a exotoxina PVL, estando associada a diversas apresentações clínicas causadas pelos CA-MRSA (David & Daum, 2010). Contudo, a classificação com base na tipagem do SCCmec tem vindo a demonstrar que não é tão precisa como era inicialmente, dada a descoberta de estirpes de CA-MRSA contendo as cassetes do tipo I, II e III (Carvalho *et al.*, 2010).

Ao longo dos anos, têm-se constatado que existem fatores de risco que predis põem a infeções causadas por CA-MRSA, sendo exemplos deles: contacto próximo com pessoas colonizadas com CA-MRSA (*e.g.* familiares que habitem em zonas com elevada prevalência destes microrganismos); utilização de drogas intravenosas; indivíduos que habitem em comunidades; falta de higiene; partilha de objetos pessoais; e indivíduos que pratiquem desportos coletivos. Assim, surtos deste patógeno têm sido reportados em diversos *settings* comunitários como, por exemplo, comunidades nativas e indígenas, equipas de desportos em que haja contacto físico, infantários, universidades e escolas, centros militares e prisões (Anderson, 2013; David & Daum, 2010; Köck *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2010).

A prevalência do CA-MRSA é ainda muito reduzida, mas tende a aumentar nos próximos anos a nível mundial. Atualmente, a prevalência estimada é inferior a 0,5%. Em 2003, um estudo conduzido por Salgado *et al.* demonstrou que a prevalência de CA-MRSA, em indivíduos sem fatores de risco, rondava os 0,24%. Um estudo mais recente demonstrou que a prevalência deste microrganismo, na Europa, varia entre 0,03 e 1,5% (Deurenberg & Stobberingh, 2008). Porém, em Portugal, a sua prevalência é ainda desconhecida (Nazareth *et al.*, 2012).

Os clones mais frequentemente descritos, atualmente, são: USA300 (ST8-IVa) e USA400 (ST1-IV) nos EUA e Clone Europeu (ST80-IVc) e Clone do Pacífico Sudoeste (ST30-IV) na Europa e Austrália, respetivamente. Dentre os clones referidos, o USA300 tem merecido especial destaque, dada a sua disseminação mundial tanto a nível da comunidade como a nível hospitalar (Miller *et al.*, 2012; Nazareth *et al.*, 2012).

Em termos clínicos, 70-80%, das infeções causadas por CA-MRSA são da pele e dos tecidos moles. Contudo, dependendo do estadió da infeção, pode originar infeções sistémicas como, por exemplo, osteomielites, bacteriémias, pneumonia necrosante e

fascite necrosante. A Figura 12 resume as principais apresentações clínicas das infecções por CA-MRSA.

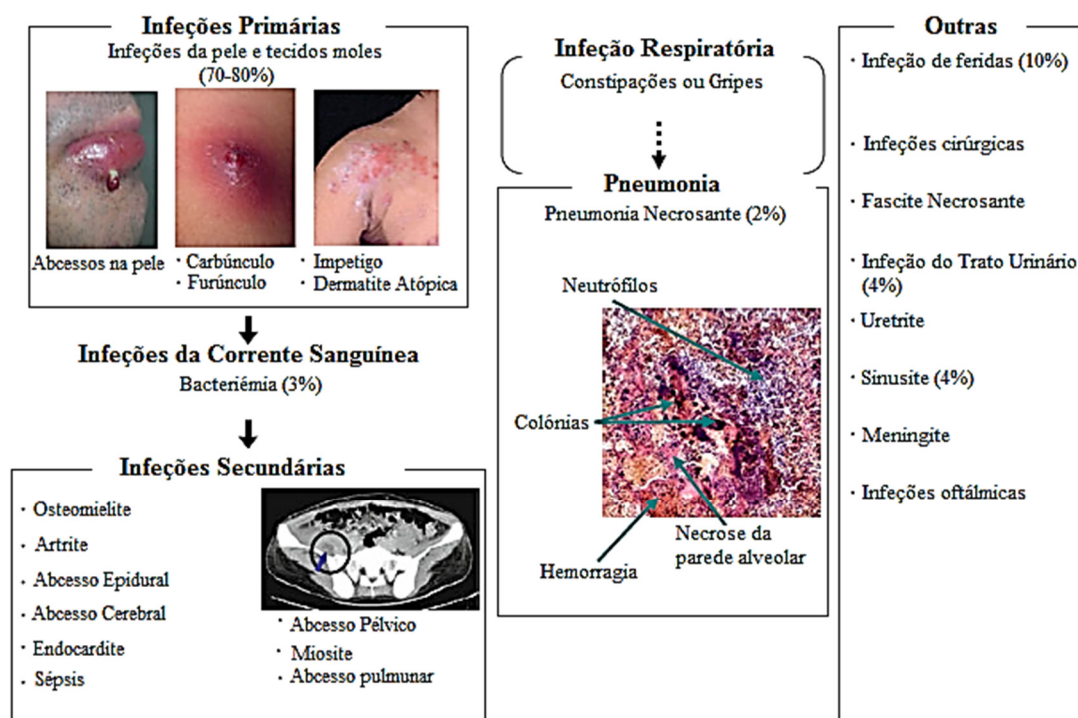


Figura 12 - Infecções causadas por CA-MRSA (Adaptado de Yamamoto et al., 2010)

Das infecções mencionadas, verificou-se que as infecções profundas da pele e tecidos moles estão, geralmente, associadas a estirpes produtoras de PVL, ao passo que os indivíduos que desenvolvem impetigo apresentam estirpes PVL-negativas. Este facto demonstra que as estirpes PVL-positivas são mais patogénicas e que estão na base de infecções mais graves, tais como a pneumonia necrosante e a fascite necrosante (Stefani *et al.*, 2012; Yamamoto *et al.*, 2010). Adicionalmente, o USA300 apresenta um elemento genético responsável pela sua capacidade de se disseminar por diversas regiões do globo e pela sua patogénica, designado *Arginine Catabolic Mobile Element* (ACME). Estudos desenvolvidos têm colocado a hipótese deste fator de virulência ter sido transmitido ao MRSA através de um *Staphylococcus epidermidis* (Yamamoto *et al.*, 2010).

O ACME é constituído por dois operões responsáveis pela sua patogénica, designados por *arc* (codifica a via patogénica da arginina desaminase) e *opp3* (codifica o sistema de oligopéptido permease). O primeiro operão permite ao microrganismo crescer em ambientes com pH ácido (nomeadamente a pele), invadir os tecidos e inibir a

proliferação de células mononucleares no sangue periférico. O segundo, por sua vez, é responsável pelo crescimento da bactéria e desenvolvimento de infeção (Gordon & Lowy, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010).

1.3.2.5. Diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA

As principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA encontram-se resumidas na Tabela 5.

Tabela 5 - Principais diferenças entre HA-MRSA e CA-MRSA (Adaptado de Yamamoto *et al.*, 2010)

HA-MRSA	Características	CA-MRSA
I, II e III	Tipo de Cassete	IV e V
Associados com os cuidados hospitalares	Fatores de Risco	Contato com pessoas portadoras ou objetos contaminados
Fossas nasais e região do períneo	Colonização	Fossas nasais e bochechas
Infeções nosocomiais	Infeções	Infeções da pele e tecidos moles
Indivíduos com idade superior a 50 anos e imunocomprometidos	Grupos etários	Indivíduos jovens e crianças, militares, reclusos, estudantes, atletas
Cerca de 21 dias	Recuperação	Cerca de 3 dias
Elevada resistência a diversas classes de antibióticos	Resistência aos Antimicrobianos	Elevada suscetibilidade aos antibióticos não β -lactâmicos

1.3.3. Colonização

Na secção 1.1.2. foram descritos os três principais padrões de colonização nasal do *S. aureus* sensíveis à meticilina (MSSA). Contudo, no caso de MRSA, ainda não é totalmente conhecido o modo como se dá este fenómeno, sobretudo para os CA-MRSA (Gupta *et al.*, 2013).

A colonização nasal por MRSA é, ainda, reduzida, atingindo uma prevalência que varia entre 1 e 8% (Rasamiravaka *et al.*, 2013). Contudo, sabe-se que este facto representa um risco acrescido para posterior infeção, sendo a severidade da mesma superior à causada por uma estirpe de MSSA. Um facto curioso é esta colonização ser mais comum no sexo feminino (Gorwitz *et al.*, 2008). Segundo Gorwitz *et al.* (2008), desde 2001 até 2004, a taxa de colonização por MRSA, nos EUA, aumentou de 0,8% para 1,5%, ao passo que a taxa de colonização por MSSA diminuiu de 32,4% para 28,6%. Os autores colocaram, como hipótese explicativa, o facto de a elevada exposição aos antibióticos suprimir o crescimento de MSSA e promover a colonização por MRSA.

1.4. Diagnóstico Laboratorial

1.4.1. Exame direto

O sucesso da deteção de microrganismos, nas amostras clínicas, depende do tipo de infeção (*e.g.* abscessos, bacteriémias, impetigo) e da qualidade do material colhido para análise. O *S. aureus* é um coco de Gram-positivo que, geralmente, se encontra disposto em formas irregulares semelhantes a um cacho de uva. Assim, o exame direto das amostras clínicas, apesar de não ser suficiente para a identificação final da bactéria, dá informação sobre a sua morfologia, podendo ser uma ferramenta importante sobretudo quando se analisa amostras contendo um elevado número de bactérias. Na maioria dos casos de infeções estafilocócicas, não está indicada a utilização de coloração de Gram nas amostras clínicas nem em alimentos (caso se trate de uma intoxicação alimentar) (Murray *et al.*, 2006).

1.4.2. Métodos Culturais

Após a colheita das amostras clínicas, estas devem ser inoculadas em meios de cultura apropriados ao seu crescimento. O *S. aureus* tem a capacidade de crescer rapidamente em meios simples e não seletivos, em aerobiose ou anaerobiose, podendo-se observar colónias lisas ao fim de 24 horas de incubação. Durante este período, as colónias vão adquirindo a sua coloração amarela/dourada, típica desta espécie, sobretudo quando incubadas à temperatura ambiente (Murray *et al.*, 2006).

Quando inoculadas em gelose de sangue de carneiro, este microrganismo produz uma enzima capaz de degradar as hemácias, designada α -toxina ou α -hemolisina. Como resultado, observa-se à volta das colónias um halo transparente, designando-se o seu tipo de hemólise como β -hemólise (Bartlett & Hulten, 2010).

Quando as amostras clínicas apresentam uma mistura de microrganismos (*e.g.* amostras colhidas do trato respiratório ou de uma ferida) é necessário utilizar meios seletivos e diferenciais. Para o *S. aureus* utiliza-se normalmente meios contendo 7,5% de cloreto de sódio (NaCl) e manitol (*e.g.* meio de Chapman). O primeiro composto inibe o crescimento da maioria dos microrganismos e, o segundo permite a diferenciação entre *S. aureus* e restantes espécies de *Staphylococcus*, dado que a primeira consegue fermentar este composto ao contrário da maioria das outras (Murray *et al.*, 2006).

1.4.3. Métodos imunológicos

Os métodos imunológicos baseiam-se essencialmente na detecção de anticorpos produzidos aquando da infeção. Geralmente, os elementos bacterianos responsáveis pela ativação do sistema imunitário humoral são os ácidos teicóicos. Em determinadas patologias (*e.g.* endocardite bacteriana), os anticorpos são detetados passadas duas semanas do início da infeção. Porém, algumas infeções têm o seu foco em locais onde o microrganismo não consegue estimular a produção destes elementos imunitários, tornando-se, assim, um método pouco fiável (Murray *et al.*, 2006).

1.4.4. Testes Bioquímicos

A identificação do *S. aureus* pode ser realizada através de testes bioquímicos, que se têm mostrado relativamente sensíveis e fiáveis. Reações positivas para a coagulase, proteína A, nucleasse termoestável e manitol são alguns exemplos de testes bioquímicos de rotina que se utilizam na identificação desta bactéria (Brown *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2006).

O teste da coagulase em tubo é o *gold standard* de identificação deste microrganismo. Este ensaio baseia-se na detecção da produção da enzima coagulase que na presença de fibrinogénio é capaz de originar um coágulo de fibrina. A verificação da formação do coágulo deve ser feita 4 horas e 24 horas após a incubação, para que se possa dar um resultado negativo. Existe, ainda, um outro ensaio, designado teste da coagulase em lâmina, que, ao contrário do anterior, se baseia na detecção da coagulase ligada à célula bacteriana e não no fator livre. É um ensaio mais rápido, mas, apesar disso, 15% das estirpes dão resultados negativos, sendo necessário confirmar com o teste da coagulase em tubo. Adicionalmente, outro teste tem sido, também, utilizado para a identificação do *S. aureus*: teste da aglutinação em látex, sendo baseado na detecção da proteína A ou fator de coagulação. O teste da DNase, também, poderá ser um ensaio a realizar, mas é necessária a confirmação posterior com um dos testes mencionados anteriormente para a identificação final (Brown *et al.*, 2005).

As galerias de identificação bioquímica consistem em *kits* comerciais que permitem identificar a bactéria, baseando-se no seu padrão de fermentação de diversos compostos (*e.g.* açúcares). Apesar disso, este método é mais dispendioso e moroso comparativamente ao teste da coagulase em tubo (Brown *et al.*, 2005; Murray *et al.*, 2006).

1.4.5. Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) e Fagotipagem

A identificação de MRSA é feita sobretudo com base no padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos. Em termos laboratoriais, a meticilina é pouco estável *in vitro* e, por isso, utiliza-se a oxacilina, extrapolando-se os resultados para todos os antibióticos pertencentes à classe das Penicilinas Resistentes às Penicilinasases. O teste de difusão dos discos em gelose, a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) (*e.g.* macrodiluição, microdiluição, E-test), o método de *screening* em gelose Mueller-Hinton com oxacilina, e os métodos automatizados são alguns exemplos de testes que permitem a identificação de MRSA. No teste de difusão dos discos em gelose, utiliza-se, para além da oxacilina, a cefoxitina, que tem demonstrado resultados mais fiáveis que o primeiro (Brown *et al.*, 2005).

Existe, ainda, outro método de identificação que consiste na fagotipagem, ou seja, na determinação da sensibilidade aos bacteriófagos, apesar de ser mais comum em investigação. O objetivo deste ensaio é verificar a suscetibilidade das bactérias à lise causada pelos bacteriófagos utilizados em cada ensaio (Murray *et al.*, 2006).

1.4.6. Testes de Biologia Molecular

Este tipo de ensaios baseia-se, essencialmente, na deteção de sequências de ácidos nucleicos, que identificam de forma inequívoca e precisa a espécie em estudo (Murray *et al.*, 2006). O método vulgarmente utilizado designa-se *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e consiste na amplificação de uma determinada sequência de DNA. Os genes normalmente pesquisados para identificação do *S. aureus* são: *nuc* (nuclease), *coa* (coagulase), *spa* (proteína A), *femA* e *femB*, *Sa442* e 16S rRNA. Além destes, também o gene *mecA* tem sido pesquisado para a identificação dos MRSA. Este método requer o isolamento prévio do microrganismo e posterior extração do seu DNA genómico, além dos *primers* com a correta sequência do gene que se pretende amplificar (Brown *et al.*, 2005).

Existem diversos tipos de PCR, sendo um dos mais utilizados o PCR em tempo real (qPCR), que se baseia na quantificação ou deteção qualitativa dos genes por emissão de fluorescência. Pode-se utilizar sondas marcadas com fluorocromos ou SYBR-green, sendo a primeira metodologia mais precisa e fiável, podendo-se fazer a deteção simultânea de vários genes (Multiplex PCR). O SYBR-green, por sua vez, é um método pouco específico, visto que se liga a qualquer fragmento de dupla cadeia de DNA e, deste

modo, corre-se o risco de detetar a amplificação de fragmentos inespecíficos. Além disso, apresenta, ainda, a desvantagem de não ser possível detetar simultaneamente, no mesmo ensaio, vários genes. Este ensaio permite obter de forma rápida os resultados, sendo a sua sensibilidade muito superior à do PCR convencional. Deste modo, qualquer falha ou imprecisão, na execução da técnica, podem facilmente conduzir a diferenças significativas nos resultados que se obtêm (Mackay, 2004).

1.4.7. Testes rápidos de rastreio de infeção por MRSA

Atualmente existem métodos de rastreio que permitem identificar os MRSA de uma forma mais rápida, mantendo a precisão e sensibilidade dos ensaios convencionais. Estes métodos de rastreio incluem: meios de cultura cromogéneos (*e.g.* MRSA ID – bioMérieux – e HardyCHROM™ MRSA – Hardy Diagnostics) e métodos moleculares (*e.g.* qPCR) (Brown *et al.*, 2005).

Os meios cromogéneos permitem que, a partir da inoculação da amostra clínica, seja possível a identificação da bactéria através da coloração da colónia obtida. Os meios para deteção de MRSA têm, geralmente, oxacilina ou Cefoxitina, permitindo apenas o crescimento das estirpes que contêm o gene *mecA*. Deste modo, estes microrganismos fermentam ou hidrolisam os compostos cromogénicos, havendo, assim, a aquisição de uma cor característica nas colónias (Figura 13) (Verkade, Elberts, Verhulst, & Kluytmans, 2009; Verkade, Ferket, & Kluytmans, 2011).

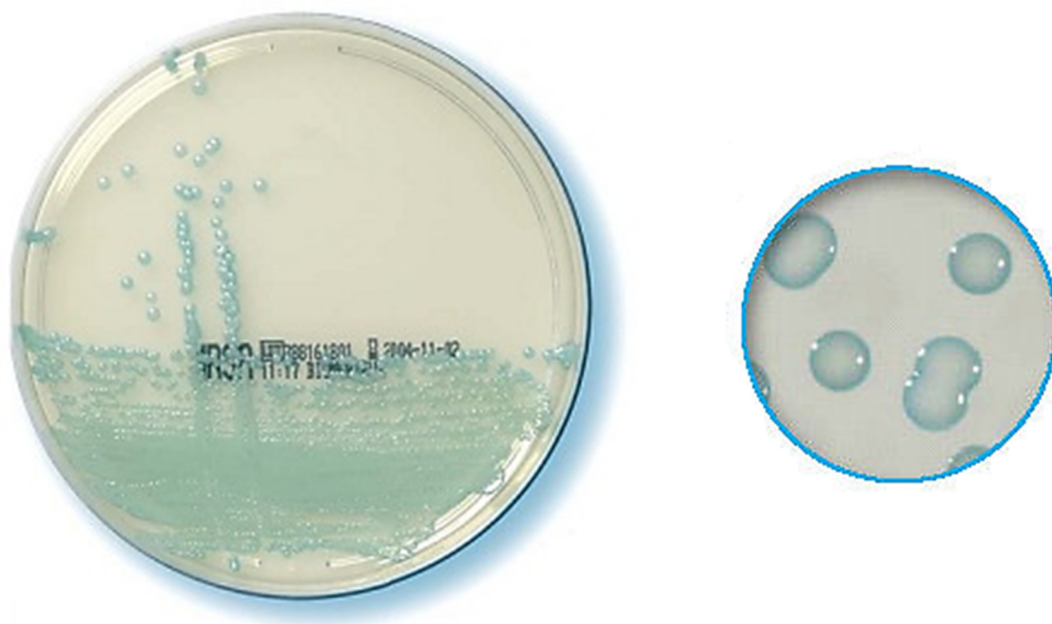


Figura 13 - MRSA ID (Adaptado de bioMérieux, 2013)

Apesar da rapidez de detecção de MRSA com os meios cromogêneos, os testes de biologia molecular fornecem os resultados mais fidedignos. Atualmente, utiliza-se PCR em tempo real com detecção simultânea de um gene específico de identificação de *S. aureus* (e.g. *nuc* e *coa*) e do gene *mecA*, a partir de amostras biológicas (Brown *et al.*, 2005).

1.5. Terapêutica Antibiótica

1.5.1. Infecção por MSSA

A terapêutica recomendada para as infecções por MSSA depende da apresentação clínica (Bamberger & Boyd, 2005). Assim, a Tabela 6 resume a terapêutica antibiótica recomendada para algumas das infecções causadas por *S. aureus*.

Tabela 6 – Antibioterapia recomendada para as infecções por MSSA (Adaptado de Gilbert, Moellering, & Eliopoulos, 2010)

Infeções		Antibióticos	Duração do tratamento
Infeção da Pele e Tecidos Moles	Não complicadas	Cefalexina, Dicloxacilina, Clindamicina ou Minociclina	5 a 7 dias
	Complicadas	PRP, Cotrimoxazol, Cefazolina ou Clindamicina	2 a 4 semanas
Bacteriémia		PRP, Cefazolina ou Vancomicina	2 a 4 semanas
Infeções associadas ao cateter			2 semanas
Endocardite Infeciosa		Vancomicina ou Daptomicina	6 semanas
		Vancomicina + Gentamicina	2 semanas
Pneumonia		PRP, Clindamicina ou Cefazolina	2 a 3 semanas
Infeções ósseas (osteomielite e artrite séptica)		PRP, Cefalosporinas de 3ª G	6 semanas
		Vancomicina + Rifampicina	

Legenda: PRP – Penicilinas Resistentes às Penicilinases; 3ª G – 3ª Geração

1.5.2. Infecção por MRSA

A antibioterapia recomendada nas infecções por MRSA deve ter por base o conhecimento da prevalência desta bactéria no local em questão e o seu perfil de suscetibilidade aos

antimicrobianos (Bamberger & Boyd, 2005). A Tabela 7 resume as principais infecções por MRSA e a terapêutica e duração de tratamento recomendados para cada uma delas.

Tabela 7 - Antibioterapia recomendada para as infecções por MRSA (Adaptado de Liu *et al.*, 2011)

<i>Infecções</i>		<i>Antibióticos</i>	<i>Duração do tratamento</i>
<i>Infecção da Pele e Tecidos Moles</i>	<i>CA-MRSA</i>	Clindamicina, Cotrimoxazol, Doxiciclina ou Minociclina ou Linezolida	5 a 10 dias
	<i>HA-MRSA</i>	Vancomicina, Linezolida, Daptomicina ou Clindamicina	7 a 14 dias
<i>Bacteriemia</i>	<i>Não complicada</i>	Vancomicina ou Daptomicina	2 semanas
	<i>Complicada</i>	Vancomicina ou doses elevadas de Daptomicina	4 a 6 semanas
<i>Endocardite Infeciosa</i>		Vancomicina ou Daptomicina	6 semanas
		Vancomicina + Rifampicina	6 semanas
		Vancomicina + Gentamicina	2 semanas
<i>Pneumonia</i>		Vancomicina ou Linezolida Clindamicina (caso seja suscetível)	7 a 21 dias
<i>Infecções ósseas (osteomielite e artrite séptica)</i>		Vancomicina ou Daptomicina	8 semanas no mínimo
		Rifampicina + (Cotrimoxazol ou Tetraciclina ou Clindamicina ou Fluoroquinolonas)	1 a 3 meses

1.6. Contextualização do Tema

Nos dias de hoje, um dos principais problemas de saúde pública é a emergência de resistências aos antibióticos. Esta temática envolve grande discussão e diversas estratégias têm vindo a ser desenvolvidas para conter possíveis surtos de bactérias multirresistentes, onde se inclui o MRSA. Deste modo, este microrganismo tem vindo a ser alvo de inúmeros estudos, com o objetivo de se conhecer as suas características moleculares e epidemiológicas.

A colonização assintomática por *S. aureus* é um tema estudado ao longo dos anos, dada a sua importância não só na sua disseminação, mas, também, no desenvolvimento de uma possível infecção no portador e noutros indivíduos que contactem com este. Os alunos de cursos superiores na área da saúde são um importante reservatório que interessa monitorizar, dada a possibilidade de transmissão deste microrganismo no seu futuro local

de trabalho (*e.g.* hospitais, indústrias farmacêuticas, farmácias comunitárias). Assim, o rastreio desta bactéria nesta população apresenta-se de extrema importância.

Em Portugal, os estudos desenvolvidos sobre esta temática são escassos e, por isso, a informação recolhida sobre este país provém essencialmente de estudos multicêntricos efetuados em diversos países da União Europeia.

Assim, o presente estudo pretende oferecer novos dados sobre a prevalência de *S. aureus*, tanto MSSA como MRSA, em alunos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) do Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM), bem como informação sobre a presença de um gene - *lukS-lukF* - que codifica um dos fatores de virulência, a PVL, característico dos CA-MRSA e que, atualmente, está implicado em síndromes graves como, por exemplo, a pneumonia necrosante. Informação sobre a suscetibilidade aos antimicrobianos será, também, um dos tópicos abordados.

Capítulo 2 – Objetivos e Questões para Investigação

2.1. Objetivos do Estudo

O presente estudo tem como principais objetivos:

- a) Caracterizar a prevalência de *S. aureus* na população estudada;
- b) Caracterizar a prevalência de *S. aureus* resistentes à Meticilina (MRSA);
- c) Estudar a presença do gene que codifica a *Panton – Valentine Leukocidin* (PVL) nos isolados de MSSA e MRSA;
- d) Estudar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos;
- e) Comparar a sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos vários métodos de identificação utilizados.

2.2. Questões para Investigação

As questões para investigação e respetivas hipóteses são:

Questão 1 – Estará o sexo do aluno relacionado com a colonização por *S. aureus*?

H₀: O sexo do aluno está relacionado com a colonização por *S. aureus*.

H₁: O sexo do aluno não está relacionado com a colonização por *S. aureus*.

Questão 2 – Estará a existência de doenças do Trato Respiratório Superior relacionada com a colonização por *S. aureus*?

H₀: A existência de doenças do Trato Respiratório Superior está relacionada com a colonização por *S. aureus*.

H₁: A existência de doenças do Trato Respiratório Superior não está relacionada com a colonização por *S. aureus*.

Questão 3 – Estará a utilização de antibioterapia, nos últimos dois meses, relacionada com a colonização por *S. aureus*?

H₀: A utilização de antibioterapia, nos últimos dois meses, está relacionada com a colonização por *S. aureus*.

H₁: A utilização de antibioterapia, nos últimos dois meses, não está relacionada com a colonização por *S. aureus*.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1. Desenho do Estudo

Neste trabalho recorreu-se a um estudo observacional transversal. Este tipo de estudo é efetuado num único momento do tempo, permitindo estimar a prevalência da colonização nasal por MSSA e MRSA e o seu padrão de suscetibilidade aos antibióticos.

3.2. População e Amostra

3.2.1. População

A população utilizada neste estudo foi constituída pelos alunos do MICF que se encontravam inscritos na Unidade Curricular (UC) de Bacteriologia Médica até ao momento da colheita da amostra biológica. Assim, estimou-se que a população em estudo eram 104 alunos.

3.2.2. Critérios de Elegibilidade

3.2.2.1. Critérios de Inclusão

Definiu-se como critérios de inclusão:

- a) Alunos que apresentassem um isolado de *S. aureus* nas fossas nasais anteriores, após isolamento e identificação com testes fenotípicos realizados nas aulas práticas laboratoriais;
- b) Que esclarecidamente aceitassem participar no estudo.

3.2.2.2. Critérios de Exclusão

Definiu-se como critério de exclusão:

- a) Alunos que apresentassem isolados de outras espécies de *Staphylococcus* nas fossas nasais anteriores, após isolamento e identificação com testes fenotípicos.

3.2.3. Amostra

A amostra foi, então, constituída pelos alunos que apresentavam um isolado de *S. aureus*, nas fossas nasais anteriores, e que, depois de devidamente esclarecidos, aceitaram participar no estudo. Assim, após isolamento e identificação com testes fenotípicos realizados na aula, a amostra obtida foi de 36 alunos. Contudo, após posterior

confirmação da identificação preliminar realizada, obteve-se uma amostra final de 25 alunos portadores de *S. aureus*.

3.3. Recolha de Informação

3.3.1. Isolados bacterianos

Um dos trabalhos da componente prática da UC de Bacteriologia Médica é o *screening* de *S. aureus* nas fossas nasais anteriores dos alunos. Assim, os isolados bacterianos foram obtidos pelos alunos, através da colheita de uma amostra biológica de cada uma das fossas nasais anteriores (direita e esquerda), seguindo a técnica de recolha indicada para posterior análise clínica microbiológica.

Os alunos com isolados positivos para *S. aureus* foram, então, convidados a participar no estudo, tendo sido prestada toda a informação necessária acerca do mesmo. Posto isto, assinaram uma Declaração de Consentimento Informado (Anexo I), autorizando a equipa de investigação a aplicar-lhes um breve questionário (Anexo II) e a estudar o seu isolado bacteriano.

O questionário, especificamente desenvolvido para o efeito, destinou-se a caracterizar sociodemograficamente a amostra e a fornecer dados sobre: 1) possíveis doenças do Trato Respiratório Superior (TRS) que o portador apresentasse; 2) exposição a Unidades de Prestação de Cuidados de Saúde (UPCS) nos últimos 6 meses; e 3) antibioterapia utilizada nos últimos 2 meses. Este elemento de recolha de informação era constituído por seis questões, apresentando-se o propósito de cada uma na Tabela 8.

Tabela 8 - Questionário para recolha de informação sociodemográfica e clínica

<i>Questão</i>	<i>Objetivo</i>
1 – Sexo 2 – Idade	Caracterização sociodemográfica
3 – História de doenças do TRS 3.1 – Quais?	
4 – Queixas no dia da colheita 5 – Exposição a UPCS nos últimos 6 meses 5.1 – Tipo de UPCS frequentada 6 – Tratamento antibiótico nos últimos 2 meses 6.1 – Antibiótico utilizado	Caracterização clínica da amostra e obtenção de informação necessária para responder às questões de investigação colocadas na secção 2.2.

3.3.2. Identificação do *S. aureus*

Após a colheita das amostras biológicas de ambas as fossas nasais, com o auxílio de uma zaragatoa, os alunos inocularam um meio de Chapman e incubaram-no a 37°C durante 18 a 20 horas. Aquando da análise da placa, procuraram-se colónias amarelas/douradas, sugestivas da presença de *S. aureus*. Posteriormente, realizaram-se os seguintes ensaios: observação da morfologia das bactérias após coloração de Gram; teste da catalase em lâmina; teste da coagulase em tubo; galeria de identificação bioquímica, designada *API*[®] *Staph* (bioMérieux, Lyon, França), tendo sido realizada apenas por alguns alunos.

O perfil fenotípico que possibilitou a identificação deste microrganismo, no decorrer da aula prática, encontra-se resumido na Tabela 9.

Tabela 9 - Perfil fenotípico para identificação de *S. aureus*

<i>Testes</i>	<i>Resultado</i>
<i>Fermentação do Manitol</i>	Positivo
<i>Catalase</i>	Positivo
<i>Coagulase</i>	Positivo

Depois de identificados nas aulas, os isolados bacterianos foram repicados para meio de Chapman e, posteriormente, para meio de TSA (*Trypticase Soy Agar*), com o objetivo de se realizar dois ensaios para confirmar a identificação feita pelos alunos: teste da coagulase em tubo e *API*[®] *Staph*.

O primeiro teste foi realizado inoculando uma a duas colónias num tubo contendo plasma de coelho, sendo, posteriormente, incubado a 37°C. Esperou-se 24 horas para confirmar os resultados e, assim, analisaram-se todos os tubos ao fim desse tempo.

Relativamente ao *API*[®] *Staph*, este foi realizado segundo as instruções do fabricante. (Anexo III). De forma a validar ambos os testes, utilizou-se o *S. aureus* ATCC 29213 como controlo positivo.

3.3.3. Identificação do *S. aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA)

Além do isolamento em meio de Chapman, foi também inoculado um meio cromogénico que permitiu a identificação direta de MRSA. O meio utilizado foi o *MRSA ID* (bioMérieux, Lyon, França), tendo sido inoculado diretamente a partir das amostras biológicas, colhidas a partir de cada uma das fossas nasais anteriores, e incubado a 37°C/18 – 24h. No dia seguinte, os alunos pesquisaram colónias com coloração

verde/turquesa, característica da produção da enzima α -glucosidase e da capacidade de crescer num meio contendo cefoxitina. No caso das placas com pouco crescimento ou sem crescimento visível, deixou-se durante mais 24 horas na estufa e avaliou-se novamente.

Outros métodos utilizados para a identificação de MRSA foram o teste de *screening* em gelose de Mueller-Hinton com oxacilina 6 μ g/ml/4% NaCl e o teste de difusão dos discos em gelose. Ambos os testes permitiram a caracterização fenotípica do MRSA e foram realizados segundo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (Anexo IV). Usaram-se como controlos: controlo positivo (*S. aureus* ATCC 43300) e controlo negativo (*S. aureus* ATCC 29213). No teste de screening o critério utilizado para classificar um isolado bacteriano como MRSA foi: crescimento de, pelo menos, uma colónia ao fim de 24 horas.

O teste de difusão dos discos em gelose foi realizado em Mueller-Hinton, utilizando-se como antibióticos, a oxacilina (1 μ g) e a cefoxitina (30 μ g) (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido). Dado que o primeiro antibiótico não confere resultados muito fiáveis, utilizou-se complementarmente o disco de cefoxitina para confirmação ou não da resistência obtida com a oxacilina (Swenson *et al.*, 2005). Os critérios utilizados para definir a suscetibilidade do isolado bacteriano encontram-se descritos na Tabela 10.

Tabela 10 - Critérios utilizados para classificação do isolado bacteriano como MRSA

<i>Antibióticos</i>	<i>Sensível</i>	<i>Intermédio</i>	<i>Resistente</i>
<i>Oxacilina</i>	≥ 13	11 - 12	≤ 10
<i>Cefoxitina</i>	≥ 22	-	≤ 21

3.3.4. PCR em Tempo Real (qPCR)

O PCR em Tempo Real (qPCR) foi utilizado para responder a dois propósitos: 1) confirmar a identificação fenotípica efetuada para os MSSA e MRSA; 2) pesquisar a presença do gene *lukS-lukF* (que codifica para a toxina PVL) nos isolados de MSSA e MRSA.

Numa primeira fase, realizou-se a extração do DNA genómico dos isolados bacterianos, através da utilização do *RTP[®] Bacteria DNA Mini Kit* (Quilaban, Lisboa, Portugal). Repicaram-se as bactérias para meio de TSA e, posteriormente, preparou-se uma

suspensão bacteriana com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, correspondente a, aproximadamente, 1×10^8 UFC/ml.

O protocolo fornecido pelo *kit* foi alterado, tendo-se diminuído o volume recomendado de *Elution Buffer D* de 200µl para, apenas, 70µl (repartidos por 35µl em cada eluição) (Anexo V). Deste modo, obteve-se um volume final mais concentrado com o DNA genómico extraído. Finalmente, para verificar se a extração efetuada foi realizada com sucesso, procedeu-se a uma electroforese em gel de agarose a 1% (p/v), utilizando-se como marcador de pesos moleculares, o *GeneRuler DNA* (Thermo Scientific, Lisboa, Portugal) (Anexo VI). A análise do gel de electroforese permitiu, ainda, inferir sobre a quantidade de DNA necessária adicionar em cada ensaio de PCR, através da intensidade da banda observada aquando da exposição à radiação UV (Figura 14).

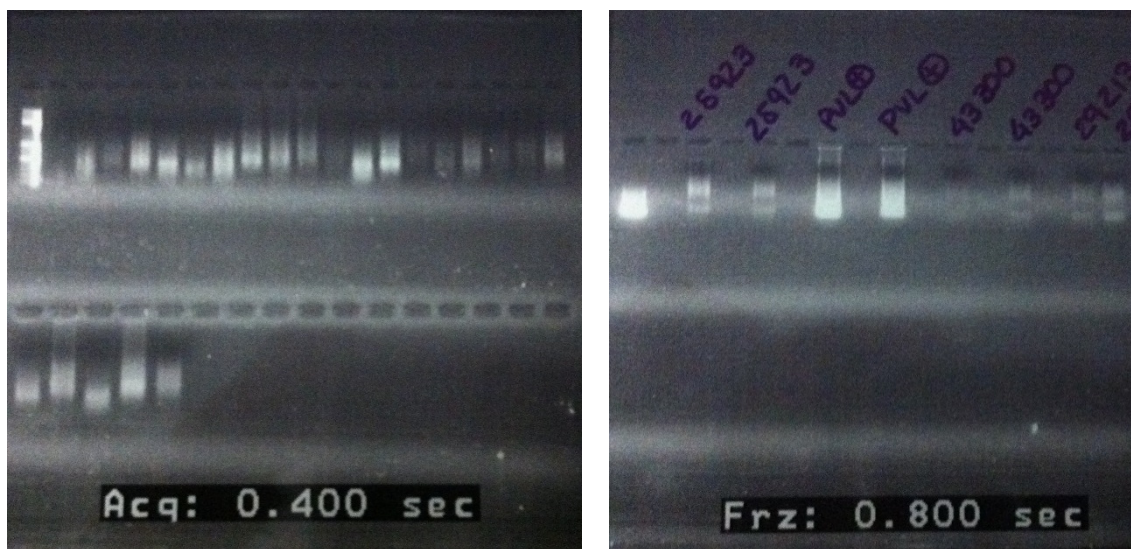


Figura 14 - Fotografias do gel de electroforese após exposição à radiação UV

O aparelho de qPCR utilizado foi o *Rotor Gene 6000* (Qiagen, Portugal) e o *kit*, para a deteção da presença dos genes, foi o *SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit* (Bioline, Portugal). A *mastermix*, incluída no *kit*, continha todos os constituintes necessários para a correta amplificação dos genes, incluindo: corante SYBR® Green, dNTPs, estabilizadores e promotores da reação (DNA polimerase), exceto os *primers*. A Tabela 11 apresenta os *primers* escolhidos utilizados (Stabvida, Caparica, Portugal), a sua sequência, temperatura de *melting* (T_m), concentração inicial e referência bibliográfica.

Tabela 11 - Primers utilizados no qPCR

<i>Primers</i>	<i>Sequência (5'----- 3')</i>	<i>T_m</i> (°C)	<i>Concentração</i> (μ M)	<i>Ref.</i>
<i>nucFor</i>	CAAAGCATCAAAAAGGTGTAGAGA	53,6	65,6	(Mcdonald <i>et al.</i> , 2005)
<i>nucRev</i>	TTCAATTTTCTTTGCATTTTCTACCA	52,5	66,7	
<i>mecA F</i>	TCCAGATTACAACCTCACCAGG	54,4	10	^2
<i>mecA R</i>	CCACTTCATATCTTGTAACG	48,2	10	
<i>lukPV1</i>	ATCATTAGGTAAAAATGTCTGGACATGATCCA	57,8	76	(Mcdonald <i>et al.</i> , 2005)
<i>lukPV2</i>	GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	56,9	73,7	

Os *primers nucFor/nucRev* e *lukPV1/lukPV2* foram reconstituídos em 1 ml de água Milipore, tendo-se, posteriormente, feito 5 alíquotas, protegidas com *Parafilm "M"* (Bemis Company, Wisconsin, EUA), de 100 μ l cada e armazenados a – 20°C. Esta divisão permitiu minimizar a contaminação do volume total dos *primers* e assegurar a sua conservação.

Antes de se realizar o ensaio com as amostras a analisar foi necessário proceder à otimização e validação do método. Todos os pontos dos ensaios foram realizados em triplicado. Assim, determinou-se primeiro qual a concentração ótima de *primers* a utilizar em cada ensaio e, posteriormente, validou-se o método através da construção de uma curva padrão. A concentração ótima de *primers* foi determinada utilizando-se diluições sucessivas de 1:10, num total de sete diluições em triplicado. A Tabela 12 apresenta a concentração ótima de *primers* determinada experimentalmente.

Tabela 12 - Concentração ótima para cada par de *primers*

<i>Primers</i>	<i>Concentração ótima (nM)</i>
<i>nucFor</i>	524,8
<i>nucRev</i>	533,6
<i>mecA F</i>	800
<i>mecA R</i>	800
<i>lukPV1</i>	608
<i>lukPV2</i>	589,6

² Estes *primers* já haviam sido utilizados num trabalho realizado anteriormente por uma aluna de Mestrado do ISCSEM.

Após este passo, procedeu-se, então, à validação do ensaio, recorrendo-se a diluições sucessivas de 1:100 do DNA do controlo positivo, num total de quatro diluições em triplicado. Segundo o Guia Técnico de qPCR, desenvolvido pelo Sigma Life Science, um ensaio é considerado validado quando apresenta uma curva padrão com os seguintes parâmetros:

- Um coeficiente de correlação de *Pearson* (r^2) > 0,985;
- Um declive entre -3,9 e -3,0;
- Uma eficiência compreendida entre 80 a 110% (Sigma Life Science, s.d.).

Em cada ensaio realizado foi necessário fazer a mistura dos constituintes, adicionando-se 10µl de 2x *SensiFAST™ SYBR No-ROX Kit*, 0,8µl de cada *primer* (*Reverse* e *Forward*) e 3,4µl de água Milipore. Depois de preparada a *mastermix*, era, então, agitada lentamente no vórtex (evitando a quebra das extremidades dos *primers*). Finalmente, adicionou-se 5µl de DNA de cada amostra e controlos, exceto nos tubos correspondentes ao branco, que continham apenas a *mastermix*. O volume final, em cada tubo de reação, foi 20µl. Os controlos de qualidade utilizados encontram-se descritos na Tabela 13.

Tabela 13 - Controlos de qualidade utilizados nos ensaios efetuados para cada gene

<i>Gene</i>	<i>Controlo Positivo</i>	<i>Controlo Negativo</i>
<i>nuc</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>E.coli</i> ATCC 10536
<i>mecA</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
<i>lukS-lukF</i>	<i>S. aureus</i> PVL-positivo ³	<i>S. aureus</i> ATCC 43300

O programa de qPCR escolhido consistiu num primeiro ciclo (ativação da DNA polimerase) a 95°C durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos: 95°C/5 segundos (Desnaturação), 62°C/10 segundos (*Annealing*) e 72°C/15 segundos (Extensão). Ao fim de cada passo de Extensão, era registada a fluorescência emitida. Finalmente, a curva de *Melting* foi obtida através da contínua emissão de fluorescência, durante a elevação da temperatura de 72 a 95°C.

³ Gentilmente cedido pela Prof. Doutora Constança Pomba.

3.3.5. Teste de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA)

Um dos Testes de Suscetibilidade aos Antibióticos (TSA) foi realizado segundo o método de *Kirby-Bauer* (teste de difusão dos discos em gelose), seguindo o protocolo proposto pelo EUCAST. A Tabela 14 resume os antibióticos utilizados para a realização dos TSA.

Tabela 14 - Antibióticos utilizados na realização dos TSA

<i>Antibióticos</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Conteúdo do disco (µg)</i>
<i>Tigeciclina</i>	TGC	15
<i>Ácido fusídico</i>	FD	10
<i>Gentamicina</i>	CN	10
<i>Tetraciclina</i>	TE	30
<i>Cotrimoxazol (Sulfametoxazol + Trimetoprim)</i>	SXT	23,75 + 1,25
<i>Ciprofloxacina</i>	CIP	5
<i>Clindamicina</i>	DA	2
<i>Eritromicina</i>	E	15
<i>Penicilina G</i>	P	10 ⁴
<i>Tobramicina</i>	TOB	10

Para a validação do ensaio, utilizaram-se como controlos de qualidade o *S. aureus* ATCC 29213 (EUCAST) e *S. aureus* ATCC 25293 (CLSI). Optou-se por escolher 2 estirpes diferentes, pois alguns dos antibióticos utilizados não têm critérios de suscetibilidade definidos pelo EUCAST, tendo sido necessário, nesse caso, recorrer aos critérios propostos pelo CLSI. Assim, utilizaram-se os critérios de suscetibilidade definidos pelo EUCAST para os seguintes antibióticos: TGC, FD, CN, TE, SXT, CIP, DA, E e TOB, e para a P utilizaram-se os critérios definidos pelo CLSI. A Tabela 15 apresenta os critérios de suscetibilidade definidos para cada antibiótico utilizado e os critérios de validação do ensaio.

Tabela 15 – Critérios de suscetibilidade e validação definidos pelo CLSI e EUCAST

A – CLSI

<i>Antibiótico</i>	<i>Sensível</i>	<i>Intermédio</i>	<i>Resistente</i>	<i>Controlo de Qualidade</i>	<i>Intervalo de aceitação</i>
<i>P</i>	≥ 29	-	≤ 28	<i>S. aureus</i> ATCC 25293	26 - 37

⁴ Neste caso, as unidades não são microgramas (µg), mas sim Unidades (U).

B – EUCAST

<i>Antibióticos</i>	<i>Sensível</i>	<i>Intermédio</i>	<i>Resistente</i>	<i>Controlo de Qualidade</i>	<i>Intervalo de aceitação</i>
TGC	≥ 18	-	< 18	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	19 - 25
FD	≥ 24	-	< 24		26 - 32
CN	≥ 18	-	< 18		19 - 25
TE	≥ 22	19 - 21	< 19		23 - 31
SXT	≥ 17	14 - 16	< 14		26 - 32
CIP	≥ 20	-	< 20		21 - 27
DA	≥ 22	19 - 21	< 19		23 - 29
E	≥ 21	18 - 20	< 18		23 - 29
TOB	≥ 18	-	< 18		20 - 26

Além do teste de difusão dos discos em gelose, foi também realizada a determinação da CMI para a vancomicina. Este ensaio foi efetuado pelo método de macrodiluição em meio líquido, seguindo-se as recomendações do CLSI (Anexo VII). Utilizou-se uma solução de vancomicina a 16µg/ml e, como controlo de qualidade, a estirpe *S. aureus* ATCC 29213. Os critérios de suscetibilidade e validação, definidos pelo CLSI, encontram-se resumidos na Tabela 16.

Tabela 16 - Critérios de suscetibilidade e validação da vancomicina

<i>Antibiótico</i>	<i>Sensível</i>	<i>Intermédio</i>	<i>Resistente</i>	<i>Controlo de Qualidade</i>	<i>Intervalo de aceitação</i>
Vancomicina	≤ 2	4 - 8	≥ 16	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5 - 2

3.3.6. Determinação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos Métodos de Identificação utilizados

Dado que se utilizaram várias metodologias para identificação do *S. aureus* e MRSA, foi possível fazer a comparação da sensibilidade e especificidade entre elas. Deste modo, para a identificação do *S. aureus*, a comparação foi feita entre o teste da coagulase em tubo, *API*[®] *Staph* e qPCR. Relativamente aos MRSA, a comparação dos parâmetros foi feita entre o teste da difusão dos discos em gelose, teste de *screening* em gelose de Mueller-Hinton com oxacilina 6µg/ml, *MRSA ID* e qPCR.

Assim, definiu-se o termo sensibilidade como a capacidade do teste identificar corretamente os isolados positivos e o termo especificidade como a capacidade do teste identificar corretamente os isolados negativos. Relativamente aos valores preditivos, definiu-se o Valor Preditivo Positivo (VPP) como a probabilidade de detetar um resultado verdadeiramente positivo dentro do universo de resultados positivos e o Valor Preditivo Negativo (VPN) como a probabilidade de detetar um resultado verdadeiramente negativo dentro do universo de resultados negativos (Akobeng, 2007). As fórmulas utilizadas no cálculo dos parâmetros em causa foram:

Sensibilidade = Verdadeiros Positivos / (Verdadeiros Positivos + Falsos Negativos);

Especificidade = Verdadeiros Negativos / (Verdadeiros Negativos + Falsos Positivos);

VPP = Verdadeiros Positivos / (Verdadeiros Positivos + Falsos Positivos);

VPN = Verdadeiros Negativos / (Verdadeiros Negativos + Falsos Negativos).

3.4. Ética e Confidencialidade

Os dados pessoais dos alunos, recolhidos durante o estudo, foram tratados com um código alfanumérico atribuído pela equipa de investigação no decorrer da realização do questionário. Assim, manteve-se a privacidade dos participantes e a confidencialidade dos dados recolhidos. O código atribuído era constituído pela turma do aluno e por um número de identificação aleatório (*e.g.* 01, 02).

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética do ISCSEM (27 de Maio de 2013). As Declarações de Consentimento Informado, depois de finalizado o estudo, foram entregues a esta comissão, juntamente com o parecer emitido pela mesma.

3.5. Análise dos dados

A análise dos dados foi feita recorrendo ao programa estatístico *IBM SPSS Statistics* v. 20,0. Foi feita uma análise descritiva de variáveis categoriais e escalares. As variáveis categoriais foram analisadas recorrendo-se às frequências relativas e absolutas. Já as variáveis escalares foram analisadas através de medidas de tendência central (média, moda e mediana) e medidas de dispersão (desvio-padrão, máximo e mínimo). Procedeu-se, ainda, a estatística bivariada para responder aos testes de hipóteses estabelecidos, recorrendo-se a testes não paramétricos (qui-quadrado simples). Considerou-se para todos os testes efetuados um IC de 95%.

As curvas de *Melt* foram realizadas com recurso ao programa *Rotor Gene* v. 6.1.93. Os resultados obtidos através do qPCR foram meramente qualitativos, ou seja, pesquisou-se, apenas, a presença do gene em estudo. Assim, os resultados das amostras analisadas foram comparados com o padrão de *Melt* do controlo positivo, utilizado em cada ensaio.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Caracterização Sociodemográfica da Amostra

Como referido na secção 3.2.3, a amostra em estudo foi constituída por 25 alunos portadores de *S. aureus*. Apesar disso, 3 deles não responderam ao questionário, pelo que, apenas, foi possível contabilizar as respostas de 22 alunos. Assim, a caracterização sociodemográfica foi feita com recurso a dois parâmetros: sexo e idade dos alunos. Na amostra estudada, verificou-se, então, que 72,7% ($n = 16$) dos alunos eram do sexo feminino (Tabela 17).

Tabela 17 - Distribuição da amostra por sexo

<i>Sexo</i>	<i>n</i>	<i>Percentagem (%)</i>
<i>Masculino</i>	6	27,3
<i>Feminino</i>	16	72,7
<i>Total</i>	22	100
<i>Missing values</i>	3	-

De acordo com a literatura, normalmente, os indivíduos que constituem as amostras obtidas, de cursos na área da saúde, são do sexo feminino e, como tal, os resultados obtidos corroboram esse facto (Du *et al.*, 2011; Shen, Akoda, & Zhang, 2013). Além disso, em Portugal, existem mais indivíduos do sexo feminino matriculados no ensino superior, demonstrando, assim, uma tendência para a existência de mais mulheres em cursos de saúde, como é o caso do MICF (PORDATA, 2013).

Relativamente à idade dos alunos, verificou-se que a média foi, aproximadamente, 22 anos ($DP = 3,415$), estando compreendidas entre um mínimo de 20 e um máximo de 34 anos. Tratando-se da análise de um ano curricular específico, é normal que as idades sejam muito próximas, não sendo possível fazer elações sobre a existência de uma relação estatisticamente significativa entre a colonização nasal por *S. aureus* e a idade do portador.

Pretendeu-se, também, estudar se existia alguma relação entre o sexo do aluno e a colonização pela bactéria em causa, ou seja, colocou-se a hipótese de um dos sexos ter maior propensão à colonização por *S. aureus* que o outro. Assim, verificou-se que não existe qualquer relação entre as duas variáveis, ou seja, a colonização nasal pelo

microrganismo parece ocorrer de forma independente do sexo do aluno ($p = 0,091$) (Tabela 18). Deste modo, rejeita-se a hipótese alternativa colocada para a Questão 1, na secção 2.2.

Tabela 18 - Associação entre a colonização nasal por *S. aureus* e o sexo do aluno

<i>Sexo</i>	<i>Colonização nasal por S. aureus</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	Sim	Não		
<i>Masculino</i>	6 (54,5%)	5 (45,5%)	11 (100,0%)	0,091
<i>Feminino</i>	16 (84,2%)	3 (15,8%)	19 (100,0%)	
<i>Total</i>	22 (73,3%)	8 (26,7%)	30 (100,0%)	

Segundo um estudo conduzido por Miller *et al.* (2009), a relação entre as duas variáveis mencionadas foi estatisticamente significativa ($p = 0,003$), sendo o sexo masculino mais associado à colonização nasal por esta bactéria. Contudo, a amostra analisada era muito heterogénea, comparativamente à amostra do presente estudo. Através dos resultados obtidos, neste estudo, poder-se-ia supor que a colonização poderia estar mais associada ao sexo feminino, dada a proporção de casos positivos vs. casos negativos.

4.2. Caracterização da prevalência de *S. aureus* na população estudada

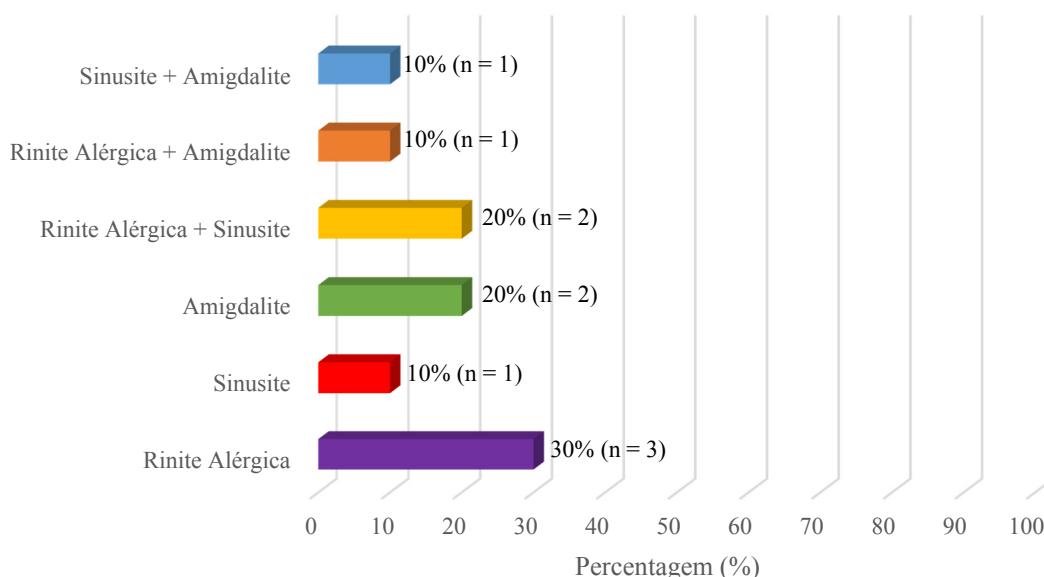
Como já referido na secção 3.2.1., a população em estudo eram 104 alunos. Desses, apenas, 25 eram portadores de *S. aureus*, tendo-se estimado, assim, uma prevalência do fenómeno de 24,04%. Estudos efetuados têm determinado prevalências do fenómeno que variam desde 15,4% a 27%, tendo o resultado obtido corroborado os dados apresentados pela literatura (Du *et al.*, 2011; Wertheim *et al.*, 2005).

Relativamente à caracterização clínica dos portadores de *S. aureus*, verificou-se que 47,6% ($n = 10$) apresentavam história de doenças do Trato Respiratório Superior (TRS) (Tabela 19).

Tabela 19 - Presença de Doenças do Trato Respiratório Superior nos alunos portadores

<i>Doenças TRS</i>	<i>n</i>	<i>Percentagem (%)</i>
<i>Sim</i>	10	47,6
<i>Não</i>	11	52,4
<i>Total</i>	21	100
<i>Missing values</i>	4	-

Dos alunos que responderam afirmativamente à questão anterior, procurou-se, então, saber quais as Doenças do TRS que apresentavam. Obteve-se, assim, que uma parte dos alunos apresentava Rinite Alérgica (30,0%; n = 3), Sinusite (10,0%; n = 1) e Amigdalite (20,0%; n = 2). A outra parte da amostra estudada, referiu apresentar duas ou mais doenças, tendo-se obtido que 20,0% (n = 2) tinham Rinite Alérgica e Sinusite, 10,0% (n = 1) apresentavam Rinite Alérgica e Amigdalite e, por fim, 10,0% (n = 1) tinham Sinusite e Amigdalite (Figura 15). Além disso, questionou-se os alunos sobre a presença de sintomatologia no dia da colheita, tendo, apenas, 2 alunos (9,1%) respondido afirmativamente a esta questão, enquanto os restantes 20 (90,9%) se encontravam assintomáticos.

**Figura 15** - Doenças do TRS apresentadas pelos portadores de *S. aureus*

Na secção 2.2., colocou-se a hipótese de a colonização por *S. aureus* estar relacionada com a existência de doenças do TRS, ou seja, um indivíduo com, por exemplo, Sinusite ter maior probabilidade de estar colonizado com a bactéria em estudo. Assim, verificou-se que a proporção de alunos com história de doenças do TRS foi substancialmente

superior no grupo de alunos colonizados. Contudo, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,092$), não se podendo rejeitar a hipótese nula. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 20.

Tabela 20 - Associação entre a colonização por *S. aureus* e a história de existência de doenças do TRS

<i>História de doenças do TRS</i>	<i>Colonização nasal por S. aureus</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	Sim	Não		
<i>Sim</i>	10 (90,9%)	1 (9,1%)	11 (100,0%)	0,092
<i>Não</i>	11 (61,1%)	7 (38,9%)	18 (100,0%)	
<i>Total</i>	22 (72,4%)	8 (27,6%)	29 (100,0%)	

Geralmente, encontra-se, na literatura, que doenças do TRS, nomeadamente, a Sinusite, estão associadas à colonização nasal por *S. aureus* (Bischoff *et al.*, 2013). Para além disso, um outro estudo demonstrou que indivíduos com Rinite Alérgica conseguem disseminar maior quantidade de bactérias no ambiente, sendo um importante reservatório e foco de surtos (Wertheim *et al.*, 2005). A falta de associação encontrada entre as duas variáveis, no presente estudo, poderá estar relacionada com a dimensão da amostra. Contudo, o p obtido poderá sugerir que com uma dimensão de amostra superior, os resultados coincidam com o descrito na literatura.

Avaliou-se, também, mais dois parâmetros com importância para a colonização por *S. aureus*, nomeadamente: a exposição a UPCS, nos últimos 6 meses, e utilização de antibioterapia, nos últimos 2 meses.

Em relação ao primeiro parâmetro, verificou-se que a maioria dos alunos portadores de um isolado de *S. aureus*, ou seja, 68,2% ($n = 15$) esteve em contacto com uma Unidade de Cuidados de Saúde, nos últimos 6 meses. A Tabela 21 resume os resultados obtidos.

Tabela 21 - Distribuição por exposição às UPCS nos últimos 6 meses

<i>Exposição às UPCS nos últimos 6 meses</i>	<i>n</i>	<i>Percentagem (%)</i>
<i>Sim</i>	15	68,2
<i>Não</i>	7	31,8
<i>Total</i>	22	100
<i>Missing values</i>	3	-

Dos alunos expostos, verificou-se que a UCPS mais descrita foi o Hospital (46,7%; n = 7), seguindo-se os Centros de Saúde (20,0%; n = 3) e as Clínicas Privadas (6,7%; n = 1). Alguns portadores referiram ter recorrido a dois *settings* distintos, durante o período mencionado: Hospital e Clínicas Privadas (13,3%; n = 2); Hospital e Centros de Saúde (13,3%; n = 2). A Figura 16 resume os resultados obtidos.

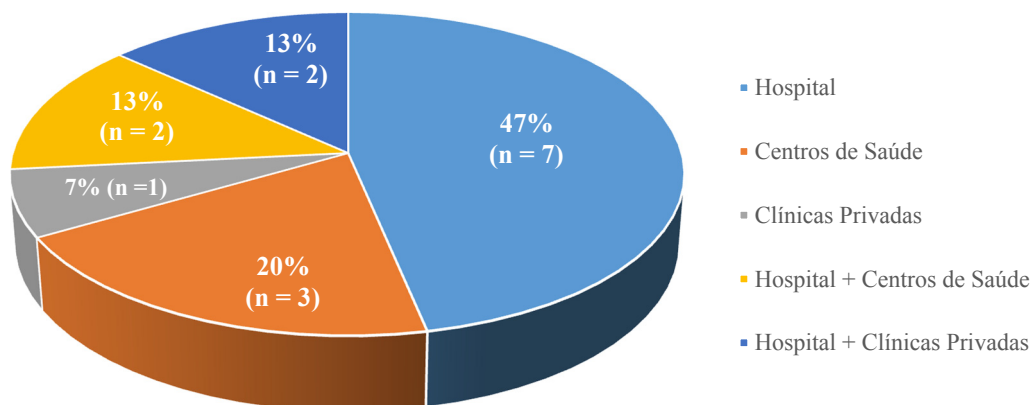


Figura 16 - UCPS frequentadas pelos alunos nos últimos 6 meses

A literatura descreve que a exposição a Unidades de Prestação de Cuidados de Saúde, nos últimos 12 meses, é um importante fator de risco que contribui para a colonização por *S. aureus*. Além disso, a aquisição deste microrganismo, a nível hospitalar, tem grande implicação na escolha da antibioterapia, dada a multirresistência apresentada por essas estirpes bacterianas (Du *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2013; Wertheim *et al.*, 2005). Assim, uma possível modificação poderia ser feita ao questionário desenvolvido, adicionando-se uma questão relativa ao motivo da exposição (*e.g.* internamento, cirurgia, consulta ou visita). Deste modo, poder-se-ia fazer elações sobre o tempo que o aluno esteve exposto e, assim, verificar a existência de uma associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

A utilização de antibioterapia é considerado um importante fator na colonização por *S. aureus* (Bischoff *et al.*, 2013; Rasamiravaka *et al.*, 2013). Assim, verificou-se que, apenas, 19,0% (n = 4) dos alunos colonizados utilizaram antibioterapia nos últimos 2 meses. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 22.

Tabela 22 - Distribuição pela utilização de antibioterapia nos últimos 2 meses

<i>Exposição a antibioterapia nos últimos 2 meses</i>	<i>n</i>	<i>Percentagem (%)</i>
<i>Sim</i>	4	19,0
<i>Não</i>	17	81,0
<i>Total</i>	21	100
<i>Missing values</i>	4	-

Dos antibióticos utilizados, observou-se que 25,0% ($n = 1$) dos portadores utilizaram Fosfomicina e outros 25,0% ($n = 1$) Amoxicilina + Ácido Clavulânico. Contudo, um dos alunos, que respondeu afirmativamente à questão, não sabia o nome comercial nem a DCI do antibiótico utilizado. Um outro aluno, apenas, referiu ter utilizado um antibiótico para erradicação de *Helicobacter pylori*. A Figura 17 detalha os resultados descritos.

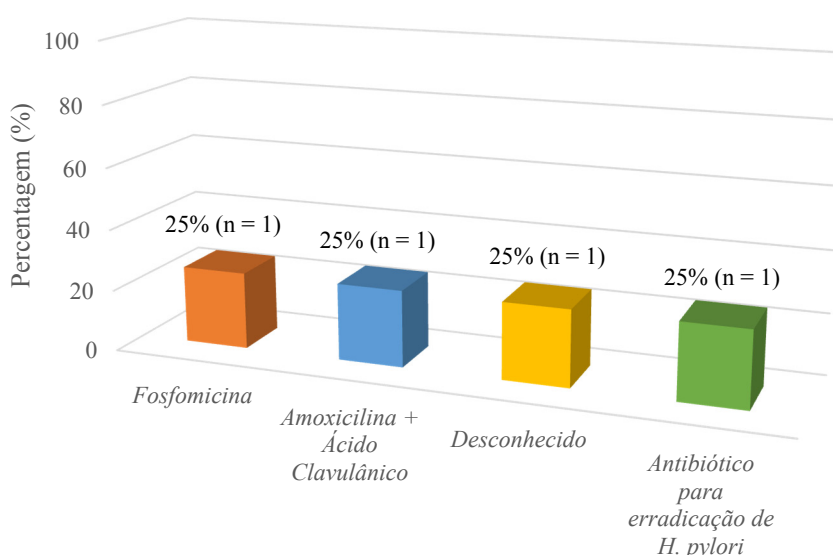


Figura 17 - Antibioterapia utilizada pelos portadores de *S. aureus*

Pretendeu-se, ainda, estudar se existe uma associação entre a exposição aos antibióticos, nos últimos dois meses, e a colonização nasal por *S. aureus*. Assim, verificou-se que a colonização por este microrganismo parece ocorrer de forma independente da utilização de antibioterapia, nos últimos 2 meses ($p = 0,282$). Deste modo, não é possível rejeitar a hipótese nula colocada para a Questão 3, da secção 2.2. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 23.

Tabela 23 - Associação entre a exposição à antibioterapia e a colonização nasal por *S. aureus*

<i>Exposição à antibioterapia</i>	<i>Colonização nasal por S. aureus</i>		<i>Total</i>	<i>p</i>
	<i>Sim</i>	<i>Não</i>		
<i>Sim</i>	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7 (100,0%)	0,282
<i>Não</i>	17 (77,3%)	5 (22,7%)	22 (100,0%)	
<i>Total</i>	21 (72,4%)	8 (27,6%)	29 (100,0%)	

A falta de associação encontrada entre as duas variáveis deve-se, essencialmente, ao mesmo motivo já referido para as outras hipóteses já testadas. A utilização de antibioterapia tem implicações, não só ao nível da colonização nasal, mas, também, na emergência de resistências (Miller *et al.*, 2012).

4.3. Caracterização da prevalência de *S. aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA)

Para além de se estimar a prevalência de colonização por *S. aureus*, pretendeu-se, ainda, determinar a prevalência de colonização nasal por MRSA. Assim, dos 25 alunos colonizados por *Staphylococcus aureus*, apenas, 1 deles apresentava um isolado de MRSA. Deste modo, a prevalência estimada, na população em estudo, foi 0,96%. Segundo a literatura, a prevalência de colonização nasal por MRSA é relativamente baixa, variando entre 1 e 8% (Rasamiravaka *et al.*, 2013). Um estudo conduzido por Shen *et al.* (2013), em estudantes universitários, estimou uma prevalência do fenómeno de 0,65%, estando, por isso, o valor encontrado, no presente estudo, de acordo com o que é descrito na literatura. O estudo mencionado foi realizado com recurso a uma metodologia laboratorial semelhante à utilizada e, por isso, confere maior confiança na comparação dos dados. No entanto, a população utilizada, no referido estudo, era, essencialmente, de raça negra e o estudo foi realizado nos EUA, o que impede uma comparação mais fiável. Como apenas 1 aluno se encontrava colonizado por MRSA, não foi possível estudar a existência de uma associação estatisticamente significativa entre a colonização nasal por este patógeno e as variáveis estudadas na secção anterior. Assim, não foi possível colocar e responder às questões para a colonização nasal por MRSA.

A partir do questionário do referido aluno, não seria possível classificar o isolado de MRSA como CA-MRSA ou HA-MRSA. Apesar de o último não ter sido exposto a UPCS, nos últimos 6 meses, a maioria dos questionários avaliam essa exposição num período de 12 meses, visto que é o critério definido para a classificação do HA-MRSA (Anderson, 2013). Assim, este critério torna a classificação epidemiológica difícil de ser aplicada, dado que é quase impossível um indivíduo não recorrer a uma Unidade de Cuidados de Saúde no espaço de 1 ano.

A colonização por este patógeno representa um fator de risco para subsequente infeção que possa surgir no portador, aquando de um internamento ou cirurgia e, além disso, os portadores desta bactéria podem facilmente disseminá-la no ambiente e, assim, introduzi-la nos diversos *settings* onde se encontrem (Gorwitz *et al.*, 2008).

4.4. Estudo da presença do gene que codifica a *Panton-Valentine Leukocidin* (PVL) nos isolados de MSSA e MRSA

Antes de se proceder à pesquisa do gene em causa nas amostras em estudo, foi necessário construir uma curva padrão, validando, assim, o ensaio. Deste modo, obteve-se os seguintes parâmetros: coeficiente de correlação de *Pearson* (r^2) de 0,992; declive igual a -3,01; e eficiência de reação de 114,78% (Figura 18). Dado que se trata de um ensaio meramente qualitativo, as exigências de validação não são tão restritas, podendo alguns parâmetros não estar dentro dos intervalos ótimos. Porém, a diferença entre os valores obtidos e os teóricos não pode ser muito marcada.

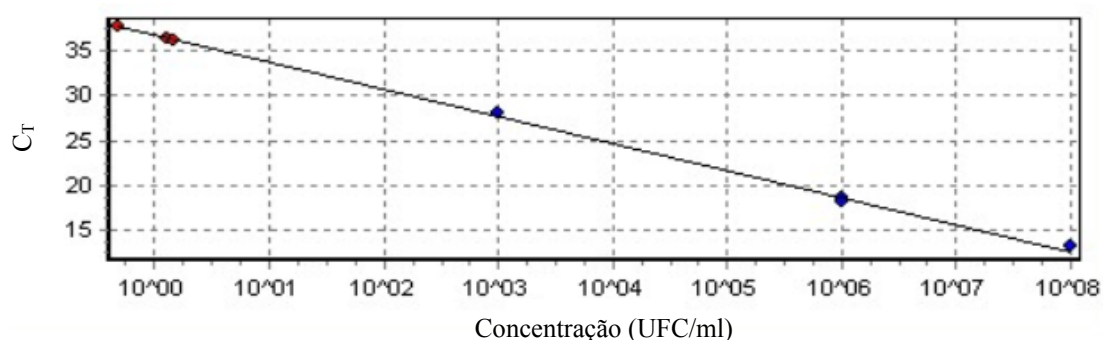


Figura 18 - Curva padrão de otimização do ensaio para o gene *lukS-lukF*

A avaliação da presença do gene foi feita por comparação com o padrão de *Melt* do controlo positivo utilizado (*S. aureus* PVL-positivo). Deste modo, obteve-se uma temperatura de *melting* (T_m) de 81,2 °C (intervalo: 76 a 88,5°C). Relativamente ao

controle negativo, a amplificação deu-se a um C_T de, aproximadamente, 36, sendo, por isso, desprezado o significado deste valor, tratando-se, apenas, de uma associação inespecífica de fragmentos de ácidos nucleicos e daí a emissão de fluorescência. Esta curva deveria ter sido realizada em todos os ensaios em que se testaram as amostras, mas tal não foi realizado de forma a cortar nos custos e, também, devido ao facto de se tratar de um ensaio de detecção e não de um ensaio quantitativo.

Relativamente à pesquisa do gene nas amostras em estudo, verificou-se que dos 25 isolados, nenhum apresentava o gene em causa e, por isso, não eram produtores de PVL. Apenas um dos isolados apresentou um pico de *Melt*, mas, apesar disso, não era sobreponível com o do controle positivo, sendo, por isso, considerado negativo (Figura 19). Além disso, o seu C_T foi na ordem dos 34, sendo já considerada uma zona de amplificação de sequências inespecíficas.

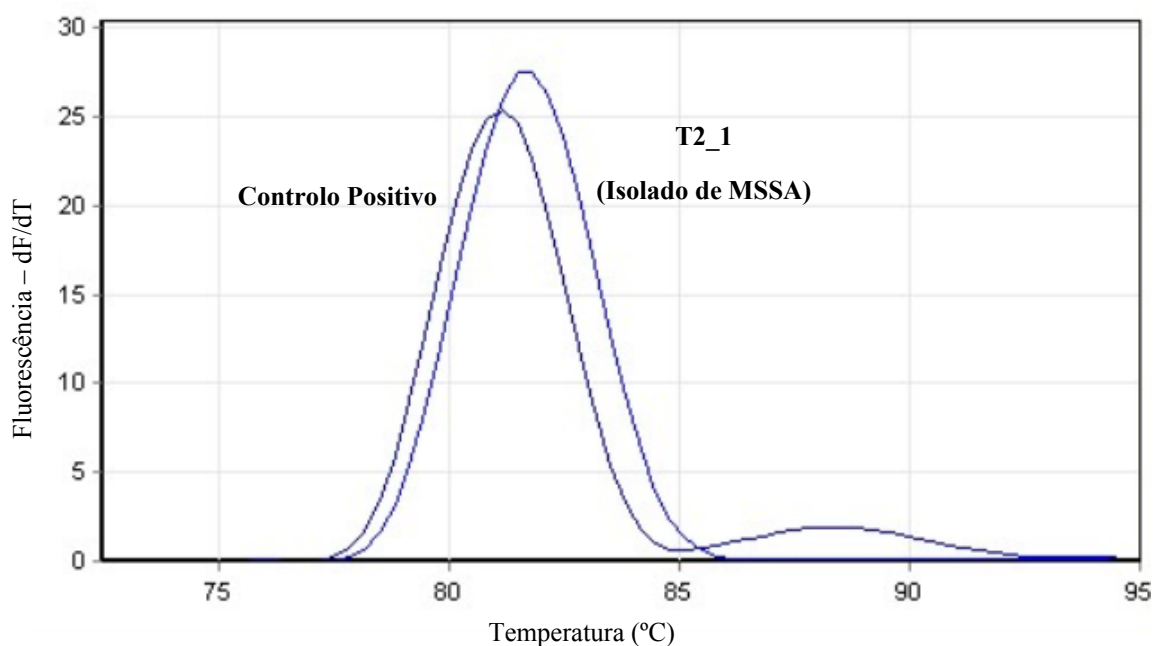


Figura 19 - Curva de Melt do gene PVL

Geralmente, os isolados que colonizam as fossas nasais anteriores, não contêm este gene e, por isso, os dados obtidos estão de acordo com a literatura descrita. Este fator de virulência parece estar mais associado a isolados bacterianos responsáveis por doença, demonstrando uma virulência superior aos isolados que se obtêm dos portadores sãos. Contudo, e dado que a transferência destes genes se faz de forma horizontal entre as bactérias, é de extrema importância o seu *screening* (Johnsson, Mölling, Strålin, & Söderquist, 2004; Munckhof *et al.*, 2009).

4.5. Estudo do perfil de suscetibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos

O teste de difusão dos discos em gelose (método de *Kirby-Bauer*) foi um dos ensaios utilizados para determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados obtidos. Numa primeira fase, realizou-se o ensaio com recurso às estirpes de *S. aureus* ATCC 29213 e 25923, por forma a validar o método. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 24.

Tabela 24 – Validação do ensaio do teste de difusão dos discos em gelose

A – CLSI

<i>Antibiótico</i>	<i>Diâmetro do halo (mm)</i>	<i>Controlo de Qualidade</i>	<i>Intervalo de aceitação</i>
P	30	<i>S. aureus</i> ATCC 25293	26 - 37

B – EUCAST

TGC	22	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	19 - 25
FD	28		26 - 32
CN	20		19 - 25
TE	26		23 - 31
SXT	27		26 - 32
CIP	24		21 - 27
DA	26		23 - 29
E	25		23 - 29
TOB	20		20 - 26

Depois de validado, procedeu-se, então, à determinação da suscetibilidade dos isolados bacterianos aos antibióticos utilizados. Assim, verificou-se que a maioria dos isolados eram sensíveis aos seguintes antibióticos: TOB (91,7%; n = 22), TE (95,8%; n = 23), CIP (100,0%; n = 24), FD (100,0%; n = 24), TGC (100,0%; n = 24) e DA (95,8%; n = 23). Relativamente à CN, SXT e E, registou-se uma resistência considerável, sendo o valor obtido, para a CN e E, de 20,8% (n = 5) e, para o SXT, de 16,7% (n = 4). O último antibiótico mencionado, foi o único em que se registou uma suscetibilidade intermédia de 4,2% (n = 1). Finalmente, a P foi o antibiótico com maior taxa de resistência, tendo-se obtido um valor de 79,2% (n = 19), como seria de esperar. A Figura 20 detalha os resultados obtidos para cada antibiótico testado.



Figura 20 - Suscetibilidade aos antibióticos – Teste de Kirby-Bauer

A determinação da CMI da vancomicina, como já referido na secção 3.3.5., foi realizada com recurso ao método da macrodiluição em meio líquido. Assim, foi realizado um primeiro ensaio com a estirpe de controlo de qualidade (*S. aureus* ATCC 29213) para a validação do método. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 25.

Tabela 25 – Validação do ensaio para determinação da CMI da vancomicina

<i>Antibiótico</i>	<i>CMI determinada</i>	<i>Controlo de Qualidade</i>	<i>Intervalo de aceitação</i>
<i>Vancomicina</i>	1 µg/ml	<i>S. aureus</i> ATCC 21293	0,5 - 2

A CMI média, determinada experimentalmente, foi de 1,92 µg/ml ($DP = 0,282$) e o mínimo e máximo de 1 e 2 µg/ml, respetivamente. Deste modo, verificou-se que todos os isolados bacterianos testados eram sensíveis à vancomicina, antibiótico de 1ª linha em infeções causadas por MRSA. A sensibilidade encontrada para a vancomicina tem sido de 100,0%, estando, assim, o valor obtido de acordo com a literatura (Wang *et al.*, 2008). O MRSA encontrado apresentava resistência, apenas, aos antibióticos β-lactâmicos e Eritromicina e, como tal, poderia classificar-se o isolado obtido como CA-MRSA, tal como dois isolados obtidos num estudo conduzido por Shen *et al.* (2013). Contudo, dado que não se procedeu à tipagem do *SCCmec*, não se poderia afirmar que se trata efetivamente de um CA-MRSA, visto que, como mencionado na secção 1.3.2.2., a cassette

do tipo I, também, contém resistência exclusiva a esta classe de antibióticos e está associada a estirpes isoladas no *setting* hospitalar.

Em relação aos restantes antibióticos, o perfil de resistência determinado está de acordo com o descrito na literatura para isolados de colonização. (Du *et al.*, 2011; Fluit, Wienders, Verhoef, & Homer, 2001). A Clindamicina é um dos antibióticos mais utilizados no tratamento de infeções da pele e tecidos moles causadas por CA-MRSA, mas, apesar disso, a utilização deste antibiótico em Portugal é muito reduzida (Adriaenssens *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2013). Assim, é justificável a baixa resistência encontrada para este antibiótico. A emergência de estirpes resistentes aos antibióticos é uma problemática atual e está relacionada com a má utilização da antibioterapia e a sua obtenção sem receita médica, sendo este fenómeno pouco monitorizado a nível de ambulatório (Miller *et al.*, 2009).

Geralmente, a definição de Multirresistência aos Antibióticos utilizada é: bactéria que seja resistente a 3 ou mais classes de antibióticos (Magiorakos *et al.*, 2011). Verificou-se que dois isolados de MSSA (8,0%) apresentavam resistência a 3 ou mais classes de antibióticos, podendo ser classificados como multirresistentes, sendo que apenas um dos portadores esteve em contacto com UPCS e nenhum deles utilizou antibioterapia nos últimos 2 meses. Estes dois alunos estão, assim, mais suscetíveis a falha terapêutica em caso de infeção por essas estirpes (Tabela 26). Um estudo realizado na Nigéria, em estudantes universitários e aldeãs, demonstrou que 52,5% dos isolados nasais foram classificados como multirresistentes aos antimicrobianos, sendo, que dessa percentagem, 12,5% eram resistentes a 4 classes de antibióticos (Onanuga & Temedie, 2011).

Tabela 26 – Isolados bacterianos multirresistentes aos antimicrobianos

<i>Isolados bacterianos</i>	<i>Classes de antibióticos às quais são resistentes</i>	<i>Exposição às UPCS nos últimos 6 meses</i>	<i>Utilização de antibioterapia nos últimos 2 meses</i>
T1_7	Aminoglicosídeos, Cotrimoxazol, Macrólidos e Penicilinas	Sim	Não
T5_9	Aminoglicosídeos, Tetraciclina, Penicilinas e intermédio ao Cotrimoxazol	Não	Não

4.6. Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos vários métodos de identificação utilizados

4.6.1. Identificação de *S. aureus*

Para a identificação do *S. aureus* utilizaram-se três ensaios: teste da coagulase em tubo, *API® Staph* e pesquisa do gene *nuc* por qPCR. Este último método foi utilizado como teste padrão, possibilitando, assim, a comparação dos parâmetros em estudo para os vários métodos de identificação utilizados. Com o teste da coagulase em tubo, obtiveram-se 24 resultados verdadeiramente positivos e 1 falso negativo, estimando-se, assim, uma sensibilidade de 96,0%. Relativamente à especificidade, obteve-se um valor de 100,0%, tendo identificado corretamente os 11 resultados verdadeiramente negativos. Adicionalmente, o VPP obtido foi de 100,0% (24/24) e o VPN de 91,67% (11/12).

Com o *API® Staph* obtiveram-se 22 resultados verdadeiramente positivos e 3 resultados falsos negativos. Deste modo, estimou-se que a sensibilidade deste método foi de 88,0%. Em relação à especificidade, o ensaio identificou corretamente 10 resultados negativos e 1 falso positivo, obtendo-se, assim, um valor de 90,9%. Além disso, o VPP obtido foi de 95,65% (22/23) e o VPN de 76,92% (10/13).

Antes de se proceder à pesquisa do gene *nuc* nos isolados bacterianos, foi necessário construir uma curva de calibração para validação do ensaio de qPCR. Assim, obtiveram-se os seguintes parâmetros de validação: coeficiente de correlação de *Pearson* (r^2) de 0,999; declive igual a -2,30; e eficiência de reação de 172,42% (Figura 21).

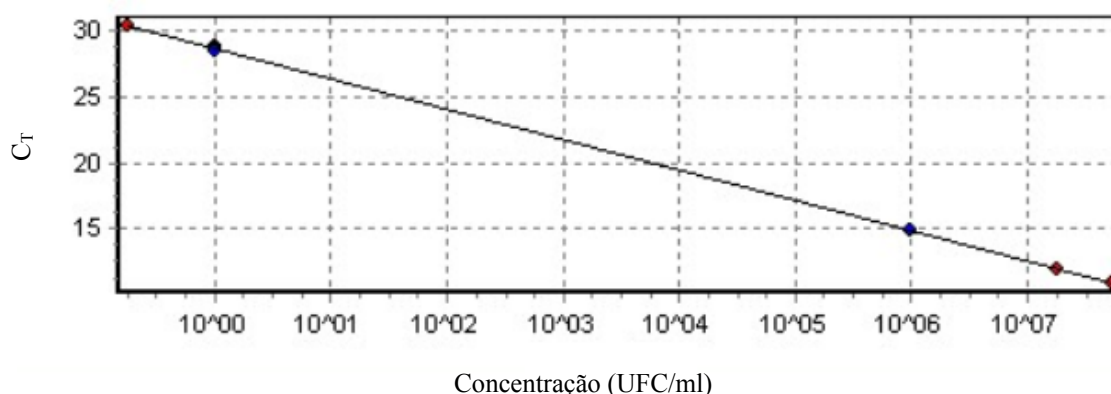


Figura 21 - Curva padrão de otimização do ensaio para o gene *nuc*

A avaliação da presença do gene foi feita por comparação com o padrão de *Melt* do controlo positivo utilizado (*S. aureus* ATCC 29213). Deste modo, obteve-se uma

temperatura de *melting* (T_m) de 78,93 °C (intervalo: 78,8 a 86,2°C). Relativamente ao controlo negativo, a amplificação deu-se a um C_T de, aproximadamente, 30, sendo, por isso, desprezado o significado deste valor, tratando-se, apenas, de uma associação inespecífica de fragmentos de ácidos nucleicos e daí a emissão de fluorescência.

Este ensaio identificou corretamente os 25 isolados de *S. aureus* e os 11 ECN, estimando-se, assim, uma sensibilidade, especificidade e valores preditivos de 100,0%. A Figura 22 ilustra a curva de *Melt* do gene *nuc*, identificando o controlo positivo e negativo e as amostras positivas.

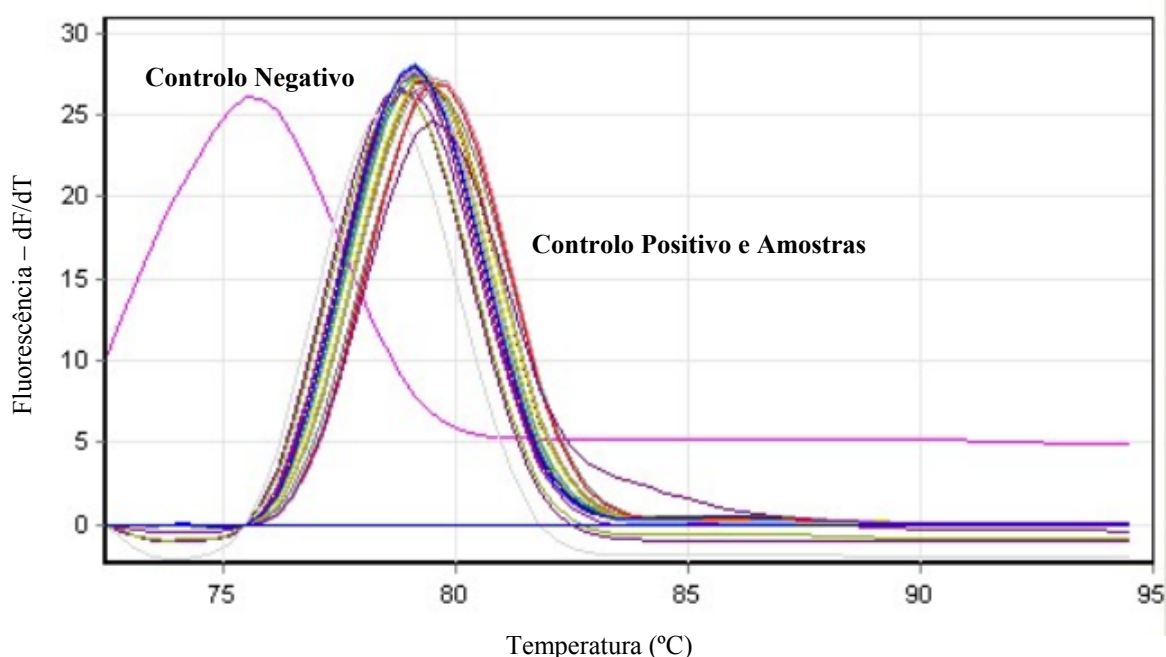


Figura 22 - Curva de *Melt* do gene *nuc*

A Tabela 27 resume os valores de sensibilidade, especificidade e valores preditivos (VPP e VPN) obtidos para os vários métodos de identificação de *S. aureus* utilizados neste estudo.

Tabela 27 – Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos ensaios de identificação de *S. aureus*

<i>Método</i>	<i>Sensibilidade (%)</i>	<i>Especificidade (%)</i>	<i>VPP (%)</i>	<i>VPN (%)</i>
<i>Teste da coagulase em tubo</i>	96,0	100,0	100,0	91,67
<i>API® Staph</i>	88	90,9	95,65	76,92
<i>qPCR</i>	100,0	100,0	100,0	100,0

Segundo Brown *et al.* (2005), a sensibilidade e especificidade dos testes de identificação bioquímica são superiores aos valores obtidos para o teste da coagulase em tubo. Contudo, os resultados estimados, no presente estudo, não estão de acordo com esses dados, demonstrando que o teste da coagulase em tubo é preferível, não só pela sensibilidade e especificidade determinadas, mas, também, por ser bem mais económico e de fácil execução, face às galerias de identificação bioquímicas. Assim, este ensaio é altamente recomendado para identificação de rotina do *S. aureus* tal como já descrito por Brown *et al.* (2005). O qPCR é o método mais sensível e específico, sendo utilizado, na maioria das vezes, como alternativa para confirmação de resultados inconclusivos, sendo, no entanto, bastante mais dispendioso que os anteriores (Brown *et al.*, 2005).

4.6.2. Identificação de MRSA

A identificação dos isolados de MRSA foi feita com recurso a quatro ensaios: meio cromogénico (*MRSA ID*), teste de difusão dos discos em gelose, teste de *screening* em gelose de Mueller-Hinton com oxacilina 6µg/ml e pesquisa do gene *mecA* por qPCR. Para os três últimos ensaios, utilizou-se como controlo positivo, a estirpe *S. aureus* ATCC 43300, de forma a identificar corretamente os isolados positivos. Relativamente aos controlos negativos, utilizaram-se o *S. aureus* ATCC 29213 e *E.coli* ATCC 10536. É importante, ainda, referir que, tal como mencionado na secção anterior, o qPCR foi utilizado como teste padrão, de forma a possibilitar a comparação dos parâmetros entre os vários teste de identificação utilizados, visto ser o método mais sensível e específico.

O meio *MRSA ID* permitiu a identificação direta do isolado bacteriano, através da coloração verde/turquesa, característica das colónias de MRSA (Figura 23). Deste modo, obteve-se 1 resultado verdadeiramente positivo e nenhum falso negativo. Estimou-se, assim, uma sensibilidade de 100,0%. Relativamente à especificidade, o valor encontrado foi de 73,9%, tendo-se obtido 17 resultados verdadeiramente negativos e 6 falsos positivos. Além disso, obteve-se um VPP e um VPN de 14,29% (1/7) e 100,0% (17/17), respetivamente.



Figura 23 - Coloração caraterística das colónias de MRSA em MRSA ID

Em relação ao teste de difusão dos discos em gelose, utilizaram-se dois discos de antibióticos: oxacilina e cefoxitina. Os resultados obtidos encontram-se descritos na Figura 24.

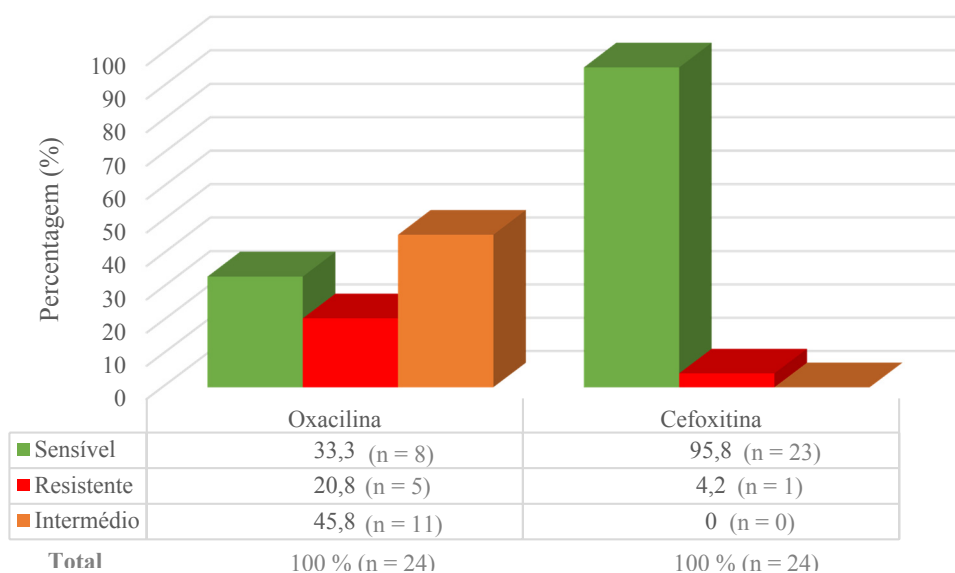


Figura 24 - Resultados do teste de suscetibilidade à oxacilina e cefoxitina

Assim, verificou-se que tanto a oxacilina como a cefoxitina identificaram corretamente o único isolado de MRSA obtido e nenhum falso negativo foi obtido, estimando-se uma sensibilidade de 100,0% para ambos. Contudo, com o disco de oxacilina, obtiveram-se 6 resultados falsos positivos e 19 verdadeiramente negativos, estimando-se uma

especificidade de 82,6%. Relativamente à cefoxitina, obtiveram-se 23 resultados verdadeiramente negativos, sendo a especificidade determinada de 100,0%. Para além disso, o VPP obtido, para a oxacilina, foi de 20,0% (1/5) e, para a cefoxitina, de 100,0% (1/1). Em relação ao VPN, ambos os antibióticos apresentaram um valor de 100,0% (19/19 – oxacilina – e 23/23 – cefoxitina).

Com o teste de *screening* em gelose de Mueller-Hinton com oxacilina 6µg/ml obteve-se um resultado verdadeiramente positivo e nenhum falso negativo, estimando-se uma sensibilidade de 100,0%. Em relação aos resultados verdadeiramente negativos, foram identificados um total de 23 e nenhum falso positivo, tendo-se obtido uma especificidade de 100,0%. Adicionalmente, obteve-se um VPP e VPN de 100,0%

Antes de se proceder à pesquisa do gene *mecA* nos isolados bacterianos, foi necessário construir uma curva de calibração para validação do ensaio de qPCR. Assim, obtiveram-se os seguintes parâmetros de validação: coeficiente de correlação de *Pearson* (r^2) de 0,999; declive igual a -3,50; e eficiência de reação de 92,99% (Figura 25).

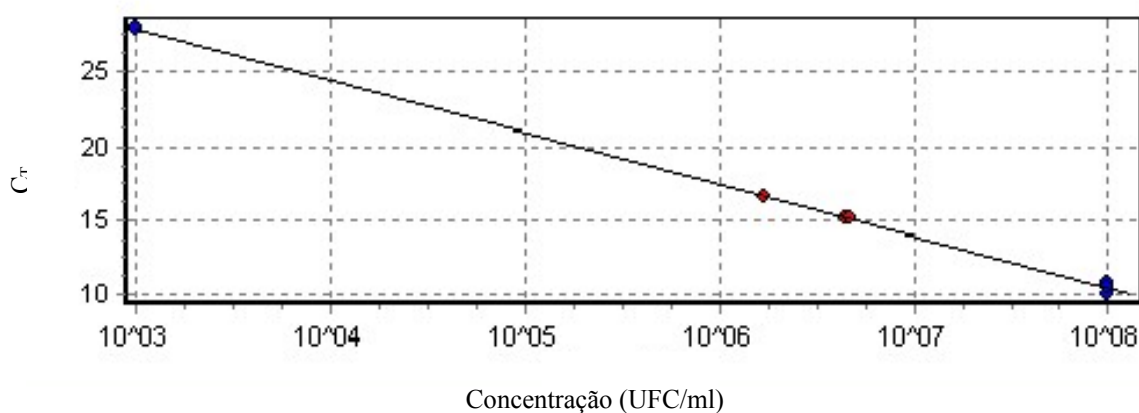


Figura 25 - Curva padrão de otimização do ensaio para o gene *mecA*

A avaliação da presença do gene foi feita por comparação com o padrão de *Melt* do controlo positivo utilizado (*S. aureus* ATCC 43300). Deste modo, obteve-se uma temperatura de *melting* (T_m) de 79,58 °C (intervalo: 79,2 a 80,0°C). Relativamente ao controlo negativo, a amplificação deu-se a um C_T correspondente à região onde se verifica normalmente a associação inespecífica de fragmentos de DNA, tendo-se desprezado o seu valor.

Este ensaio identificou corretamente o único isolado de MRSA e os 23 MSSA, estimando-se, assim, uma sensibilidade, especificidade e valores preditivos (VPP e VPN) de 100,0%. A Figura 26 ilustra a curva de *Melt* do gene *mecA*, identificando o controlo positivo e a amostra positiva.

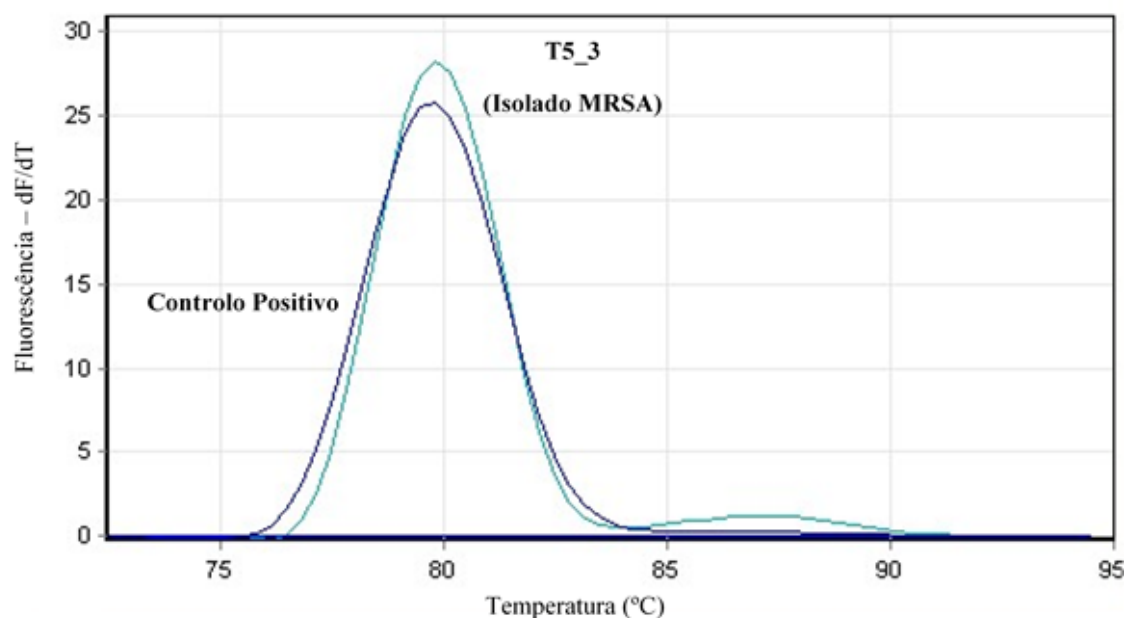


Figura 26 - Curva de *Melt* do gene *mecA*

A Tabela 28 resume os valores de sensibilidade e especificidade obtidos para os vários métodos de identificação de MRSA utilizados, neste estudo.

Tabela 28 - Comparação da sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos ensaios de identificação de MRSA utilizados

<i>Método</i>	<i>Sensibilidade (%)</i>	<i>Especificidade (%)</i>	<i>VPP (%)</i>	<i>VPN (%)</i>
MRSA ID	100,0	73,9	14,29	100,0
Disco de Oxacilina	100,0	82,6	20,0	100,0
Disco de Cefoxitina	100,0	100,0	100,0	100,0
Screening em gelose de MH com Oxacilina 6µg/ml	100,0	100,0	100,0	100,0
qPCR	100,0	100,0	100,0	100,0

É importante referir que a sensibilidade e VPP determinados, para os referidos ensaios, se encontram sobrestimada e subestimada, respetivamente, devido ao facto de, apenas, haver um isolado MRSA, não sendo suficiente para uma correta estimativa deste parâmetro. O teste de difusão dos discos em gelose, utilizando a oxacilina, é visto como

um teste pouco sensível e específico, quando comparado com os restantes métodos de identificação. Tal facto poderá estar relacionado com a hiperprodução de β -lactamases, conferindo, assim, o fenótipo resistente ao antibiótico em causa (Mathews, Thomas, Appalaraju, & Jayalakshmi, 2010). Diversos grupos de investigadores referem que a utilização do disco de Cefoxitina confere resultados que se correlacionam melhor com a presença do gene *mecA*, sendo um potente indutor do sistema regulador desse gene (Mathews *et al.*, 2010; Swenson *et al.*, 2005). Em relação ao meio cromogénico, *MRSA ID*, espera-se que apresente uma elevada sensibilidade e especificidade, dada a identificação direta a partir de amostras biológicas. Apesar disso, verificou-se que a especificidade do método ficou aquém do que se esperaria encontrar, tendo-se verificado na literatura valores superiores ao encontrado (Diederen *et al.*, 2006). Finalmente, o teste de *screening* em gelose de Mueller-Hinton com oxacilina 6 μ g/ml permite confirmar o resultado negativo obtido com o disco de oxacilina, dado que, por vezes, torna-se difícil avaliar o diâmetro do halo obtido.

4.7. Limitações do Estudo

Este estudo apresenta várias limitações, sendo uma das principais referente aos resultados. Estes representam uma amostra por conveniência, obtida de uma instituição de ensino, e, por isso, não podem ser generalizados para prever a prevalência em outras instituições. O desenho de estudo utilizado é também uma importante limitação, não permitindo a diferenciação dos vários padrões de colonização, dado que, apenas, se colheu uma amostra num único momento do tempo. Adicionalmente, o facto de existir uma escassez de estudos nesta área, em Portugal, também, contribui para a impossibilidade de comparação dos resultados obtidos, sendo, apenas, possível comparar com outros países.

Uma das principais limitações, observada no decorrer da análise bivariada, foi o facto de não se ter aplicado o questionário aos alunos não colonizados e, deste modo, a dimensão da amostra ser reduzida (25 alunos), face à que se poderia ter obtido, ou seja, 104 alunos.

4.8. Pontos fortes do Estudo realizado

Depois de realizada uma revisão bibliográfica, constatou-se que, tanto quanto sabemos, só existe um estudo português que inclui o tipo de população estudada, ou seja, estudantes

universitários, sendo, por isso, o presente estudo inovador nesse aspeto (Marques, Barbosa, Alves, & Moreira, 2010). Refere-se, ainda, que foi o primeiro isolado de MRSA identificado em estudantes universitários no distrito de Lisboa. Além disso, este estudo permitiu, não só caracterizar a prevalência de colonização nasal, mas, também, a correlação da mesma com alguns dos fatores de risco descritos na literatura. Adicionalmente, pesquisou-se o gene *lukS-lukF*, cujo reconhecimento tem sido cada vez maior na comunidade científica, dada a sua capacidade de causar síndromes severos. Porém, poucos estudos têm sido realizados, em Portugal, para avaliar a sua presença nos isolados de colonização.

4.9. Perspetivas Futuras

No seguimento deste trabalho, a equipa de investigação gostaria de caracterizar geneticamente o isolado de MRSA, através do método de MLST, e obter, também, nova amostra biológica do aluno em questão, com o intuito de seguir o estado de colonização.

Adicionalmente, e adaptando a metodologia utilizada neste estudo, poder-se-ia realizar um projeto com vista a estudar a prevalência de colonização nasal, por *S. aureus* e MRSA, nos vários anos curriculares do MICF e, posteriormente, observar as variações entre eles, particularmente nos alunos pós-estágio. Poder-se-ia, também, comparar com os restantes cursos do ISCSEM, ou seja, analisar este fenómeno em todos os cursos desta instituição e, posteriormente, comparar os dados obtidos. Assim, a proposta passa pela colheita de amostras biológicas das fossas nasais anteriores e das mãos, de forma a se poder estudar a correlação existente entre a colonização dos dois locais do organismo. Além disso, a colheita deveria ser feita em vários momentos do tempo, permitindo, então, a distinção entre os três tipos de padrões de colonização. Adicionalmente, esta última ideia poderia ter outro objetivo para além do mencionado, dado que analisando os contatos próximos dos alunos portadores, poder-se-ia fazer elações sobre a disseminação do microrganismo entre dois ou mais alunos. Para confirmar o último pressuposto, seria necessário, então, utilizar métodos de tipagem para verificar se o clone seria o mesmo.

Capítulo 5 – Conclusões

Neste estudo, verificou-se que 25, dos 104 alunos, se encontravam colonizados por *S. aureus* e, apenas, um, dos 25 alunos, apresentava um isolado de MRSA. Assim, obteve-se uma prevalência de colonização nasal por *S. aureus* e MRSA de 24,04% e 0,96%, respetivamente. Adicionalmente, verificou-se que nenhum dos isolados bacterianos apresentava o gene que codifica para a exotoxina PVL, sendo, por isso, concordante com o descrito na literatura.

Em relação ao perfil de resistência, verificou-se que a maioria dos isolados bacterianos eram sensíveis aos antibióticos testados, tendo-se obtido uma elevada taxa de resistência à penicilina G e uma taxa moderada à gentamicina, cotrimoxazol e eritromicina, estando, por isso, de acordo com o descrito para isolados de colonização. Adicionalmente, identificaram-se dois isolados bacterianos classificados como sendo multirresistentes aos antibióticos.

Dos testes de identificação utilizados, observou-se que o teste de coagulase em tubo é um excelente teste de rotina para a identificação de *S. aureus* e que a cefoxitina parece estar a ganhar reconhecimento como teste de identificação de MRSA, sendo este último facto confirmado pelo presente estudo, dada sua utilidade na deteção destas estirpes. Adicionalmente, constatou-se que o teste de *screening* em meio de Mueller-Hinton com oxacilina é um bom teste de rastreio e barato.

Em suma, este estudo apresenta dados sobre a prevalência da colonização nasal por *S. aureus* e MRSA em estudantes universitários, tendo este fenómeno importância, não só no posterior risco de infeção no portador são, mas também na disseminação deste patógeno na comunidade. Além disso, e tratando-se de futuros profissionais de saúde, a importância torna-se, ainda mais marcada, dado o risco de contaminação e disseminação num futuro local de prestação de cuidados de saúde, nomeadamente um hospital.

Bibliografia

- Abimanyu, N., Krishnan, A., Murugesan, S., Subramanian G, K., Gurumurthy, S., e Krishnan, P. (2013). Use of Triplex PCR for Rapid Detection of PVL and Differentiation of MRSA from Methicillin Resistant Coagulase Negative Staphylococci. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*, 7(2), 215–8. doi:10.7860/JCDR/2013/4523.2731
- Academy of Pediatrics. (2013). Red Book Online. [Consultado em 13 de Setembro de 2013]; Disponível em:
<http://aapredbook.aappublications.org/content/1/SEC131/SEC263/F2033.expansion.html>
- Adriaenssens, N., Coenen, S., Versporten, A., Muller, A., Minalu, G., Faes, C., ... Goossens, H. (2011). European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient macrolide, lincosamide and streptogramin (MLS) use in Europe (1997-2009). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66 Suppl 6(Ddd), vi37–45. doi:10.1093/jac/dkr456
- Akobeng, A. K. (2007). Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 96(3), 338–41. doi:10.1111/j.1651-2227.2006.00180.x
- Ammerlaan, H. S. M., Kluytmans, J. a J. W., Wertheim, H. F. L., Nouwen, J. L., e Bonten, M. J. M. (2009). Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage: a systematic review. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 48(7), 922–30. doi:10.1086/597291
- Anderson, D. (2013). Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in adults. *UpToDate*. [Consultado em 23 de Setembro de 2013]; Disponível em:<http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-of-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-infection-in-adults>

- Archer, G. L. (1998). Staphylococcus aureus: a well-armed pathogen. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 26(5), 1179–81. [Consultado em 9 de Setembro de 2013]; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597249>
- Argudín, M. Á., Mendoza, M. C., e Rodicio, M. R. (2010). Food poisoning and Staphylococcus aureus enterotoxins. *Toxins*, 2(7), 1751–73. doi:10.3390/toxins2071751
- Bal, a. M., Garau, J., Gould, I. M., Liao, C. H., Mazzei, T., Nimmo, G. R., ... Tenover, F. C. (2013). Vancomycin in the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infection: End of an era? *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1(1), 23–30. doi:10.1016/j.jgar.2013.01.002
- Bamberger, D., e Boyd, S. (2005). Management of Staphylococcus aureus Infections. *American Family Physician*, 72(12), 2474–2481.
- Bartlett, A. H., e Hulten, K. G. (2010). Staphylococcus aureus pathogenesis: secretion systems, adhesins, and invasins. *The Pediatric infectious disease journal*, 29(9), 860–1. doi:10.1097/INF.0b013e3181ef2477
- Berkthold, M., Grif, K., Mäser, M., Witte, W., Würzner, R., e Orth-Höller, D. (2012). Genetic characterization of Panton-Valentine leukocidin-producing methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Western Austria. *Wiener klinische Wochenschrift*, 124(19-20), 709–15. doi:10.1007/s00508-012-0244-8
- Bien, J., Sokolova, O., e Bozko, P. (2011). Characterization of Virulence Factors of Staphylococcus aureus: Novel Function of Known Virulence Factors That Are Implicated in Activation of Airway Epithelial Proinflammatory Response. *Journal of pathogens*, 2011, 601905. doi:10.4061/2011/601905
- BioMérieux. (2013). Chromogenic Culture Media. [Consultado em 1 de Outubro de 2013]; Disponível em : http://www.biomerieux.ch/servlet/srt/bio/switzerland/dynPage?open=SWT_CLN_PRD&doc=SWT_CLN_PRD_G_PRD_CLN_9&pubparams.sform=9&lang=fr_ch

- Bischoff, W. E., Wallis, M. L., Tucker, K. B., Reboussin, A., Sherertz, R. J., e Wake, S. (2013). Staphylococcus aureus Nasal Carriage in a Student Community: Prevalence, Clonal Relationships, and Risk Factors. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 25(6), 485–491.
- Boyle-Vavra, S., e Daum, R. S. (2007). Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the role of Pantón-Valentine leukocidin. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 87(1), 3–9. doi:10.1038/labinvest.3700501
- Brown, D. F. J., Edwards, D. I., Hawkey, P. M., Morrison, D., Ridgway, G. L., Towner, K. J., ... Working, J. (2005). Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(11), 1000–1018. doi:10.1093/jac/dki372
- Carvalho, K., Mamizuka, E., e Filho, P. (2010). Methicillin/Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus as a hospital and public health threat in Brazil. *Brazil Journal of Infections Diseases*, 14(1), 71–76.
- Chambers, H. F., e Deleo, F. R. (2010). Waves of Resistance: Staphylococcus aureus in the Antibiotic Era. *Nature Reviews Microbiology*, 7(9), 629–641. doi:10.1038/nrmicro2200.Waves
- Cole, C., e Gazewood, J. (2007). Diagnosis and treatment of impetigo. *American family physician*, 75(6), 859–64. [Consultado em 18 de Setembro de 2013]; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17390597>
- David, M. Z., e Daum, R. S. (2010). Community-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clinical microbiology reviews*, 23(3), 616–87. doi:10.1128/CMR.00081-09
- Deurenberg, R. H., Vink, C., Kalenic, S., Friedrich, a W., Bruggeman, C. a, e Stobberingh, E. E. (2007). The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Clinical microbiology and infection : the official publication*

of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 13(3), 222–35. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x

Deurenberg, Ruud H, e Stobberingh, E. E. (2008). The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 8(6), 747–63. doi:10.1016/j.meegid.2008.07.007

Diederens, B. M. W., Leest, M. Van, Duijn, I. Van, Willemse, P., Keulen, P. H. J. Van, e Kluytmans, J. A. J. W. (2006). Performance of MRSA ID , a New Chromogenic Medium for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, 44(2), 586–588. doi:10.1128/JCM.44.2.586

Du, J., Chen, C., Ding, B., Tu, J., Qin, Z., Parsons, C., ... Yu, F. (2011). Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of nasal *Staphylococcus aureus* isolates from a Chinese medical college campus. *PloS one*, 6(11), e27328. doi:10.1371/journal.pone.0027328

Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M.-élisabeth, Tristan, A., e Vandenesch, F. (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus*. *Medicine/Sciences*, 26(11), 943–949.

Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H., e Spratt, B. G. (2002). The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(11), 7687–92. doi:10.1073/pnas.122108599

Fluit, A. C., Wielders, C. L. C., Verhoef, J., e Homer, H. (2001). Epidemiology and Susceptibility of 3 , 051 *Staphylococcus aureus* Isolates from 25 University Hospitals Participating in the European SENTRY Study. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), 3727–3732. doi:10.1128/JCM.39.10.3727

Fuda, C., Suvorov, M., Sergei, B., Mobashery, S., Chem, J. B., e Vakulenko, S. B. (2004). Enzyme Catalysis and Regulation: The Basis for Resistance to β -Lactam Antibiotics by Penicillin-binding Protein 2a of Methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 40802–40806. doi:10.1074/jbc.M403589200
- Gelatti, L. C., e Becker, A. P. (2009). Staphylococcus aureus resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. *Anais Brasileiros Dermatologia*, 84(5), 501–506.
- Gharibi, O., Mirzaei, K., Zakerhussaini, M., e Darabi, H. (2012). Prevalence of methicillin - resistant Staphylococcus aureus at the Hospital of the medical University of Bushehr in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 6(23), 5035–5038. doi:10.5897/AJMR12.656
- Gilbert, D. N., Moellering, R. C., e Eliopoulos, G. M. (2010). *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy* (40ª Edição.).
- Gordon, R. J., e Lowy, F. D. (2008). Pathogenesis of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection. *Clinical infectious diseases*, 46(5), 1–16.
- Gorwitz, R. J., Kruszon-Moran, D., McAllister, S. K., McQuillan, G., McDougal, L. K., Fosheim, G. E., ... Kuehnert, M. J. (2008). Changes in the prevalence of nasal colonization with Staphylococcus aureus in the United States, 2001-2004. *The Journal of infectious diseases*, 197(9), 1226–34. doi:10.1086/533494
- Gould, F. K., Denning, D. W., Elliott, T. S. J., Foweraker, J., Perry, J. D., Prendergast, B. D., ... Watkin, R. W. (2012). Guidelines for the diagnosis and antibiotic treatment of endocarditis in adults: a report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(2), 269–89. doi:10.1093/jac/dkr450
- Gupta, K., Martinello, R. a, Young, M., Strymish, J., Cho, K., e Lawler, E. (2013). MRSA nasal carriage patterns and the subsequent risk of conversion between patterns, infection, and death. *PloS one*, 8(1), e53674. doi:10.1371/journal.pone.0053674
- Holmes, N. E., Johnson, P. D. R., e Howden, B. P. (2012). Relationship between vancomycin-resistant Staphylococcus aureus, vancomycin-intermediate S. aureus,

- high vancomycin MIC, and outcome in serious *S. aureus* infections. *Journal of clinical microbiology*, 50(8), 2548–52. doi:10.1128/JCM.00775-12
- Howden, B. P., Davies, J. K., Johnson, P. D. R., Stinear, T. P., e Grayson, M. L. (2010). Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 99–139. doi:10.1128/CMR.00042-09
- Hsu, A. R., e Hsu, J. W. (2012). Topical review: skin infections in the foot and ankle patient. *Foot & ankle international*. / *American Orthopaedic Foot and Ankle Society and Swiss Foot and Ankle Society*, 33(7), 612–9. doi:10.3113/FAI.2012.0612
- Huang, H., Flynn, N. M., King, J. H., Monchaud, C., Morita, M., e Cohen, S. H. (2006). Comparisons of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and hospital-associated MSRA infections in Sacramento, California. *Journal of clinical microbiology*, 44(7), 2423–7. doi:10.1128/JCM.00254-06
- Jahamy, H., Ganga, R., Al Raiy, B., Shemes, S., Nagappan, V., Sharma, M., ... Khatib, R. (2008). *Staphylococcus aureus* skin/soft-tissue infections: the impact of SCCmec type and Pantón-Valentine leukocidin. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 40(8), 601–6. doi:10.1080/00365540701877312
- Johansen, L. K., e Jensen, H. E. (2013). Animal models of hematogenous *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in long bones : a review. *Orthopedic Research and Reviews*, 5, 51–64.
- Johnsson, D., Mölling, P., Strålin, K., e Söderquist, B. (2004). Detection of Pantón-Valentine leukocidin gene in *Staphylococcus aureus* by LightCycler PCR: clinical and epidemiological aspects. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(10), 884–9. doi:10.1111/j.1469-0691.2004.00976.x
- Kobayashi, S. D., Musser, J. M., e Deleo, F. R. (2012). Genomic Analysis of the Emergence of Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 3(4), 3–5. doi:10.1128/mBio.00170-12.Copyright

- Köck, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., ... Friedrich, a W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 15(41), 19688. [Consultado em 27 de Setembro de 2013]; Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961515>
- Lappin, E., e Ferguson, A. J. (2009). Gram-positive toxic shock syndromes. *The Lancet infectious diseases*, 9(5), 281–90. doi:10.1016/S1473-3099(09)70066-0
- Liu, C., Bayer, A., Cosgrove, S. E., Daum, R. S., Fridkin, S. K., Gorwitz, R. J., ... Rybak, M. J. (2011). Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the Treatment of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Infections in Adults and Children. *Clinical infectious diseases*, 52(February), 1–38. doi:10.1093/cid/ciq146
- Lo, W.-T., e Wang, C.-C. (2011). Panton-Valentine leukocidin in the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Pediatrics and neonatology*, 52(2), 59–65. doi:10.1016/j.pedneo.2011.02.008
- Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance : the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1265–1273. doi:10.1172/JCI200318535.In
- Mackay, I. M. (2004). Real-time PCR in the microbiology laboratory. *CMI*, 10(3), 190–212.
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Hindler, J. F. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria : an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(5), 268–281.
- Marques, J., Barbosa, J., Alves, I., e Moreira, L. (2010). *Staphylococcus aureus* nasal and hand carriage among students from a Portuguese health school. *British Journal of Biomedical Science*, 67(1), 5–8.

- Mathews, A. A., Thomas, M., Appalaraju, B., e Jayalakshmi, J. (2010). Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*. [Consultado em 14 de Outubro de 2013]; Disponível em: <http://www.ijpmonline.org/article.asp?issn=03774929;year=2010;volume=53;issue=1;spage=79;epage=82;aulast=Mathews>
- Mathews, C. J., e Coakley, G. (2008). Septic arthritis : current diagnostic and therapeutic algorithm. *Current Opinion in Rheumatology*, 20, 457–462.
- Mcdonald, R. R., Antonishyn, N. A., Hansen, T., Snook, L. A., Nagle, E., Mulvey, M. R., ... Horsman, G. B. (2005). Development of a Triplex Real-Time PCR Assay for Detection of Panton-Valentine Leukocidin Toxin Genes in Clinical Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(12), 6147–6149. doi:10.1128/JCM.43.12.6147
- Melo-Cristino, J., Resina, C., Manuel, V., Lito, L., e Ramirez, M. (2013). First case of infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *The Lancet*. [Consultado em 23 de Outubro de 2013]; Disponível em: [http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(13\)61219-2/fulltext](http://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(13)61219-2/fulltext)
- Miller, L. G., Eells, S. J., Taylor, A. R., David, M. Z., Ortiz, N., Zychowski, D., ... Daum, R. S. (2012). *Staphylococcus aureus* colonization among household contacts of patients with skin infections: risk factors, strain discordance, and complex ecology. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(11), 1523–35. doi:10.1093/cid/cis213
- Miller, M., Cook, H. a, Furuya, E. Y., Bhat, M., Lee, M.-H., Vavagiakis, P., ... Lowy, F. D. (2009). *Staphylococcus aureus* in the community: colonization versus infection. *PloS one*, 4(8), e6708. doi:10.1371/journal.pone.0006708
- Munckhof, W. J., Nimmo, G. R., Schooneveldt, J. M., Schlebusch, S., Stephens, a J., Williams, G., ... Giffard, P. (2009). Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*, including community-associated methicillin-resistant strains, in Queensland adults. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society*

- of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(2), 149–55. doi:10.1111/j.1469-0691.2008.02652.x
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., e Pfaner, M. A. (2006). *Microbiología médica* (5 ed.). Elsevier.
- Nazareth, R., Gonçalves-Pereira, J., Tavares, A., Miragaia, M., de Lencastre, H., Silvestre, J., ... Póvoa, P. (2012). Infecção por staphylococcus aureus metilicina-resistente da comunidade em Portugal. *Revista portuguesa de pneumologia*, 18(1), 34–8. doi:10.1016/j.rppneu.2011.05.007
- Onanuga, a, e Temedie, T. C. (2011). Nasal carriage of multi-drug resistant Staphylococcus aureus in healthy inhabitants of Amassoma in Niger delta region of Nigeria. *African health sciences*, 11(2), 176–81.
- Otto, M. (2013). Community-associated MRSA: What makes them special? *International journal of medical microbiology: IJMM*, 303(6-7), 324–30. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.007
- PORDATA. (2013). Alunos matriculados no ensino superior: total e por sexo. [Consultado em 7 de Outubro de 2013]; Disponível em: <http://www.pordata.pt/Portugal/Alunos+matriculados+no+ensino+superior+total+e+por+sexo-1048>
- Rasamiravaka, T., Rasoanandrasana, S., Zafindraibe, N. J., Olivat, A., Alson, R., e Rasamindrakotroka, A. (2013). Evaluation of methicillin-resistant Staphylococcus aureus nasal carriage in Malagasy patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 7(4), 318–322. doi:10.3855/jidc.2460
- Ray, P., Gautam, V., e Singh, R. (2011). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in developing and developed countries: implications and solutions. *Regional Health Forum*. [Consultado em 26 de Setembro de 2013]; Disponível em: http://www.searo.who.int/publications/journals/regional_health_forum/media/2011/V15n1/rhfv15n1p74.pdf

- Rybak, M., e LaPlante, K. (2005). Community Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus: A Review. *Pharmacotherapy*. [Consultado em 20 de Setembro de 2013]; Disponível em:
http://www.medscape.com/viewarticle/497754_4
- Santos, D. O., Leal, B., Ferreira, A., Rodrigues, C. R., e Castro, H. C. (2007). Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43(6), 413–423.
- Sigma Life Science (s.d.). qPCR Technical Guide, 1–42.
- Shen, H., Akoda, E., e Zhang, K. (2013). Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Carriage among Students at a Historically Black University: A Case Study. *International journal of microbiology*, 2013, 979734. doi:10.1155/2013/979734
- Smith, J., e Sandall, M. (2012). Staphylococcus Scalded Skin Syndrome in the newborn: A case review. *Journal of Neonatal Nursing*, 18(6), 201–205. doi:10.1016/j.jnn.2012.08.004
- Spratt, B. G. (2012). The 2011 Garrod Lecture: From penicillin-binding proteins to molecular epidemiology. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(7), 1578–88. doi:10.1093/jac/dks109
- Srinivasan, A., Dick, J. D., e Perl, T. M. (2002). Vancomycin Resistance in Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 430–438. doi:10.1128/CMR.15.3.430
- Stefani, S., Chung, D. R., Lindsay, J. a, Friedrich, A. W., Kearns, A. M., Westh, H., e Mackenzie, F. M. (2012). Meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. *International journal of antimicrobial agents*, 39(4), 273–82. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.09.030
- Swenson, J. M., Tenover, F. C., Study, D., Sacramento, W., Rothberg, J., e Wood, R. (2005). Results of Disk Diffusion Testing with Cefoxitin Correlate with Presence of mecA in Staphylococcus spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 3818–3823. doi:10.1128/JCM.43.8.3818

- Takeda, D. (s.d.). Colleague of the Canyons. [Consultado em 13 de Setembro de 2013]; Disponível em: <http://www.canyons.edu/Faculty/takedad/micro/bacteria/index.htm>
- Van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. a, Paterson, D. L., e Gosbell, I. B. (2012). Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical microbiology reviews*, 25(2), 362–86. doi:10.1128/CMR.05022-11
- Verkade, E, Elberts, S., Verhulst, C., e Kluytmans, J. (2009). Performance of Oxoid Brilliance™ MRSA medium for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : an in vitro study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 28(9), 1443–1446. doi:10.1007/s10096-009-0802-9
- Verkade, Erwin, Ferket, M., e Kluytmans, J. (2011). Clinical evaluation of Oxoid Brilliance MRSA Agar bioMérieux MRSA ID medium for detection of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 60(3), 905–908. doi:10.1099/jmm.0.021964-0
- Wang, H., Liu, Y., Sun, H., Xu, Y., Xie, X., e Chen, M. (2008). In vitro activity of ceftibiprole, linezolid, tigecycline, and 23 other antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates in China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 62(2), 226–9. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.003
- Wertheim, H. F. L., Melles, D. C., Vos, M. C., Leeuwen, W. Van, Belkum, A. Van, Verbrugh, H. A., e Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 751–762.
- Witte, W. (2009). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: what do we need to know? *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15 Suppl 7, 17–25. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.03097.x
- Yamamoto, T., Nishiyama, A., Takano, T., Yabe, S., Higuchi, W., Razvina, O., e Shi, D. (2010). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: community transmission, pathogenesis, and drug resistance. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 16(4), 225–54. doi:10.1007/s10156-010-0045-9

Anexo I – Declaração de Consentimento Informado

Declaro saber que o Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz (ISCSEM), no âmbito da Unidade Curricular de Estágio – Trabalho Experimental de Investigação, está a realizar um estudo designado “*Antimicrobial resistance profiles and presence of PVL genes in nasal carriage isolates of Staphylococcus aureus*”, com os objetivos de estudar a prevalência de *Staphylococcus aureus* na amostra, a prevalência de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), a presença do gene *Panton – Valentine Leukocidin* (PVL) nos isolados de *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina (MSSA) e *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e, ainda, estudar o perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados.

Tendo aceite participar no estudo de investigação, declaro saber que a minha participação consiste em:

1. Responder a um breve questionário que me será feito pelo aluno que se encontra a desenvolver o trabalho e/ou regente da Unidade Curricular de Bacteriologia Médica;
2. Autorizar a utilização do meu isolado bacteriano no estudo de investigação em questão.

Compreendo que existem direitos e deveres que devo cumprir no decorrer do estudo em que aceitei participar. Tenho o direito de poder desistir a qualquer momento do estudo e de os dados que forneci serem tratados de forma confidencial.

Código de identificação do Aluno: _____

Turma: _____

(Assinatura do Aluno)

(Assinatura do Investigador)

Anexo II – Questionário

Código ID do Aluno: _____

Turma: _____

1. Sexo: Masculino ☐ Feminino ☐

2. Idade: _____

3. Tem história de doenças do Trato Respiratório Superior (TRS)?

Sim ☐

Não ☐

3.1. Se respondeu sim, quais?

Rinite Alérgica ☐

Sinusite ☐

Amigdalite ☐

Outras ☐ _____

4. Apresenta queixas no dia da colheita?

Sim ☐

Não ☐

5. Este em contacto com Unidades de Prestação de Cuidados de Saúde (UPCS) nos últimos 6 meses?

Sim ☐

Não ☐

5.1. Se respondeu sim, que tipo de UPCS frequentou?

Hospital ☐

Outros ☐ _____

Centro de Saúde ☐

Clínicas Privadas ☐

6. Fez algum tratamento antibiótico nos últimos 2 meses?

Sim ☐

Não ☐

6.1. Se respondeu sim, qual o antibiótico que utilizou?

Anexo III – Protocolo de API® Staph

REF 20 500

api® Staph

Sistema de identificação dos estafilococos, micrococcos e semelhantes

07469K - pt - 2009/11

IVD

INTRODUÇÃO E OBJECTIVO DO TESTE

O API Staph é um sistema padronizado para a identificação dos géneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* que comporta mini-testes bioquímicos assim como uma base de dados. A lista completa das bactérias possíveis de identificar com este sistema encontra-se no Quadro de Identificação no final deste folheto informativo.

PRINCÍPIO

A galeria API Staph comporta 20 microtubos que contêm substratos desidratados. Os microtubos são inoculados com uma suspensão bacteriana efectuada em API Staph Medium que reconstitui os testes. As reacções produzidas durante o período de incubação traduzem-se por alterações coloridas espontâneas ou reveladas pela adição de reagentes.

A leitura destas reacções é feita com o Quadro de Leitura e a identificação é feita com o Catálogo Analítico ou com um sistema de identificação.

APRESENTAÇÃO (embalagem de 25 testes)

- 25 galerias API Staph
- 25 caixas de incubação
- 25 ampolas de API Staph Medium
- 25 fichas de resultados
- 1 folheto informativo

COMPOSIÇÃO

Galeria

A composição da galeria API STAPH está indicada no quadro de leitura deste folheto informativo.

Meio

API Staph Medium 6 ml	Extracto de levedura Bactiopeptona (origem bovina/porcina) NaCl Oligoelementos Água desmineralizada pH : 7,0 - 7,4	0,5 g 10 g 5 g 10 ml q.b. 1000 ml
--------------------------	--	---

REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Reagentes

- Óleo de parafina (Ref. 70 100)
- Reagentes : VP 1 + VP 2 (Ref. 70 422)
- NIT 1 + NIT 2 (Ref. 70 442)
- ZYM A (Ref. 70 494)
- ZYM B (Ref. 70 493)
- McFarland Standard (Ref. 70 900)
- Catálogo Analítico API Staph (Ref. 20 590) ou sistema de identificação *apiweb*™ (Ref. 40 011) (consultar a bioMérieux)

Materiais

- Pipetas ou PSIpets
- Suporte para ampolas
- Protector de ampola
- Equipamento geral de laboratório de bacteriologia

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

- Para diagnóstico *in vitro* e controlo microbiológico.
- Unicamente para uso profissional.
- Este dispositivo contém componentes de origem animal. O controlo da origem e/ou do estado sanitário dos animais não podem garantir de maneira absoluta que estes produtos não contenham nenhum agente patogénico transmissível, é recomendado manipulá-los com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos (não ingerir, não inalar).
- As amostras, culturas bacterianas e produtos semeados devem ser considerados potencialmente infecciosos e manipulados de maneira apropriada. As técnicas assépticas e as precauções habituais de manipulação para o grupo bacteriano estudado devem ser respeitadas durante toda a manipulação, consultar o "CLSI M29-A, *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline – Revisão em vigor*". Para informações complementares sobre as precauções de manipulação, consultar o "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories – CDC/NIH – Última edição", ou a regulamentação em vigor no país de utilização.
- Não utilizar os reagentes após a data de validade.
- Antes da utilização, assegurar-se de que a embalagem e os componentes não estão danificados.
- Não utilizar galerias que tenham sofrido uma alteração física: cúpula deformada, saqueta/sachet desidratante aberta, ...
- Abrir cuidadosamente as ampolas, como abaixo indicado :



- Colocar a ampola no protector de ampola.
- Segurar o conjunto verticalmente numa mão (com a tampa branca para cima).
- Fechar correctamente a tampa.
- Pressionar horizontalmente com o polegar a parte estriada da tampa de modo a partir a extremidade da ampola.
- Retirar a ampola do protector de ampola e guarde-o para uma posterior utilização.
- Retirar delicadamente a tampa.
- O comportamento funcional apresentado é obtido com o procedimento indicado neste folheto informativo. Qualquer desvio à metodologia pode alterar os resultados.
- A interpretação dos resultados do teste deve ser efectuada tendo em conta o contexto clínico ou outro, a origem da amostra, os aspectos macro e microscópicos da estirpe/cepa e, eventualmente, os resultados de outros testes, especialmente do antibiograma.
- É aconselhado efectuar um controlo de qualidade antes de utilizar cada nova ampola de reagente ZYM B.

ap® Staph

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

As galerias e meios conservam-se a 2°-8°C até à data de validade indicada na embalagem.

AMOSTRAS (COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO)

O API Staph não deve ser utilizado directamente em amostras de origem clínica ou outras. Os microrganismos a identificar devem primeiro ser isolados num meio de cultura adaptado segundo as técnicas habituais de bacteriologia.

PROCEDIMENTO

Preparação da galeria

- Juntar fundo e tampa de uma caixa de incubação e distribuir cerca de 5 ml de água destilada ou desmineralizada [ou qualquer água sem aditivo ou derivados susceptíveis de libertar gases (Ex : Cl₂, CO₂,...)] nos alvéolos para criar uma atmosfera húmida.
- Inserir a referência da estirpe/cepa na lingueta lateral da caixa. (Não inscrever a referência na tampa, esta pode ser movida durante a manipulação).
- Retirar a galeria da embalagem individual.
- Colocar a galeria numa caixa de incubação.

Preparação do inóculo

- Efectuar uma pré-cultura em gelose Columbia com sangue (ou Agar P) 18-24 h a 36°C ± 2°C.
- Verificar se a estirpe/cepa pertence à família dos *Micrococcaceae* (morfologia, Gram, catalase...), bem como a sua pureza.
- Abrir uma ampola de API Staph Medium como indicado no parágrafo "Precauções de utilização".
- Preparar uma suspensão bacteriana homogénea, de opacidade equivalente a 0,5 de McFarland. Utilizar de preferência culturas recentes (18-24 horas). A suspensão deve ser utilizada imediatamente após a sua preparação.

Inoculação da galeria

- Encher os tubos da galeria utilizando uma pipeta ou uma PSIpeta com API Staph Medium semeada. Encher unicamente os tubos e não as cúpulas, sem ultrapassar o nível do tubo. Para evitar a formação de bolhas no fundo dos tubos, colocar a ponta da pipeta ou a PSIpeta de lado na cúpula, inclinando ligeiramente a caixa de incubação para a frente.
- Criar uma anaerobiose nos testes *ADH* e *URE* enchendo as suas cúpulas com óleo de parafina para formar um menisco convexo.
- Fechar novamente a caixa de incubação.
- Incubar a 36°C ± 2°C durante 18-24 horas.

LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Leitura da galeria

- Após incubação, ler as reacções consultando o Quadro de Leitura adicionando 1 gota de cada um dos reagentes seguintes :
 - Teste VP : VP 1 e VP 2.
Esperar 10 minutos. Uma cor rosa ou violeta indica uma reacção positiva. Uma cor rosa pálida ou rosa clara obtida após 10 minutos deve ser considerada negativa.
 - Teste NIT : NIT 1 e NIT 2.
Esperar 10 minutos. Uma coloração vermelha indica uma reacção positiva.
 - Teste PAL : ZYM A e ZYM B (*).
Esperar 10 minutos. Uma coloração violeta indica uma reacção positiva.
- (*) É aconselhado controlar cada ampola de reagente ZYM B antes da 1ª utilização. Para isso, recomenda-se a utilização da estirpe/cepa ATCC 700404 indicada no parágrafo Controlo de Qualidade para excluir qualquer reagente defeituoso.
- Anotar os resultados na ficha de resultados.

Teste de resistência à lisostafina

Determinar a resistência à lisostafina num meio Agar P segundo o método seguinte. Semear por inundação a superfície de uma gelose Agar P com uma suspensão bacteriana de cerca de 10⁷ germes/ml. Deixar secar 10-20 min a 36°C ± 2°C. Depositar à superfície da gelose, uma gota de uma solução de lisostafina a 200 µg/ml. Incubar 18-24 h a 35°-37°C. Uma lise total ou subtotal da cultura bacteriana indica uma sensibilidade à enzima. Este teste constitui o 21º teste da galeria. É considerado positivo em caso de resistência à lisostafina.

Interpretação

A identificação é obtida a partir do perfil numérico.

- Determinação do perfil numérico :
Na ficha de resultados, os testes são separados por grupos de três e um valor 1, 2 ou 4 é indicado para cada um. Adicionando em cada grupo os números correspondentes às reacções positivas, obtêm-se 7 algarismos que constituem o perfil numérico.
- Identificação :
É efectuada a partir da base de dados (V 4.1)
* com o Catálogo Analítico :
 - Pesquisar o perfil numérico na lista dos perfis.
* com o sistema de identificação *apiweb*™ :
 - Introduzir manualmente no teclado o perfil numérico com números.



6 706 113 *Staphylococcus epidermidis*

CONTROLO DE QUALIDADE

Os meios, galerias e reagentes são objecto de controlos de qualidade sistemáticos nas diferentes etapas do seu fabrico. O Controlo de Qualidade Mínimo pode ser utilizado para verificar que as condições de armazenamento e de transporte não tiveram impacto no comportamento funcional da galeria API STAPH. Este controlo pode ser efectuado seguindo as instruções e critérios esperados acima em relação ao referencial CLSI M50-A Quality Control for Commercial Microbial Identification Systems.

O controlo pode ser efectuado utilizando a estirpe/cepa *Staphylococcus capitis* ATCC[®] 35861 para avaliar o comportamento funcional do teste XYL. Os estudos efectuados pela bioMérieux demonstraram que na galeria API STAPH, o teste XYL é o teste mais sensível. Ao efectuar o controlo, a integridade da galeria pode ser verificada utilizando a estirpe/cepa *Staphylococcus capitis* ATCC 35861.

No caso de Controlo de Qualidade Completo, é exigido para esta galeria que seja efectuado o teste com as três estirpes/cepas seguintes para verificar as reacções positivas e negativas da maioria dos testes da galeria API STAPH.

1. *Staphylococcus capitis* ATCC 35861
2. *Staphylococcus xyloosus* ATCC 700404
3. *Staphylococcus lentus* ATCC 700403

ATCC : American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA.

	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	URE
1.	-	+	+	+	-	-	-	V	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
2.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	V	-	+	+	+	+	-	+
3.	-	+	+	+	+	+	+	+	V	+	+	V	V	+	+	+	+	+	-	-

* Este resultado pode variar em função do meio de cultura utilizado.

Perfis obtidos após cultura das estirpes/cepas em gelose de sangue carneiro.

É da responsabilidade do utilizador assegurar que o controlo de qualidade é efectuado em conformidade com a legislação local em vigor.

LIMITES DO TESTE

- O sistema API Staph destina-se à identificação das espécies mencionadas na base de dados (consultar o Quadro de identificação no final do folheto informativo), e apenas a estas. Não pode ser utilizado para identificar outros microrganismos ou excluir a sua presença.
- Devem apenas ser utilizadas culturas puras contendo um único tipo de microrganismo.

RESULTADOS ESPERADOS

Consultar o Quadro de identificação no final deste folheto informativo para saber os resultados esperados para as diferentes reacções bioquímicas.

COMPORTAMENTO FUNCIONAL

- Estafilococos
Foram testadas 2104 estirpes/cepas de diversas origens e estirpes/cepas de colecção pertencentes às espécies da base de dados :
- 92,49 % das estirpes/cepas foram correctamente identificadas (com ou sem testes complementares).
- 4,42 % das estirpes/cepas não foram identificadas.
- 3,09 % das estirpes/cepas foram mal identificadas.

• Micrococcos /Kocuria

Foram testadas 171 estirpes/cepas de diversas origens e estirpes/cepas de colecção pertencentes às espécies da base de dados :
- 87,72 % das estirpes/cepas foram correctamente identificadas (com ou sem testes complementares).
- 7,60 % das estirpes/cepas não foram identificadas.
- 4,68 % das estirpes/cepas foram mal identificadas.

ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

Eliminar os reagentes utilizados ou não utilizados, bem como os materiais descartáveis contaminados, em conformidade com os procedimentos relativos aos produtos infecciosos ou potencialmente infecciosos. É da responsabilidade de cada laboratório gerir os resíduos e os efluentes que este produz consoante a sua natureza e o seu perigo, e assegurar (ou fazer assegurar) o tratamento e a eliminação em conformidade com as regulamentações aplicáveis.

QUADRO DE LEITURA

TESTES	COMPONENTES ACTIVOS	QUANT (mg/cóp.)	REACÇÕES / ENZIMAS	RESULTADO	
				NEGATIVO	POSITIVO
0	Nenhum		Testemunho negativo	vermelho	—
GLU	D-glucose	1,56	(Testemunho positivo) (D-GLucose)		
FRU	D-fructose	1,4	acidificação (D-FRuctose)		
MNE	D-manose	1,4	acidificação (D-ManNose)		
MAL	D-maltose	1,4	acidificação (MALtose)		
LAC	D-lactose (origem bovina)	1,4	acidificação (LACtose)	vermelho *	amarelo
TRE	D-trehalose	1,32	acidificação (D-TREhalose)		
MAN	D-manitol	1,36	acidificação (D-MANNitol)		
XLT	xilitol	1,4	acidificação (XILitol)		
MEL	D-melibiose	1,32	acidificação (D-MELibiose)		
NIT	nitrito de potássio	0,08	Redução dos nitratos em nitritos	incolor-rosa pálido	vermelho
PAL	β-naftil fosfato	0,0244	Fosfatase Alcalina	amarelo	violeta
VP	Piruvato de sódio	1,904	produção de acetil metil-carbinol (Voges Proskauer)	incolor-rosa pálido	violeta-rosa
RAF	D-rafinose	1,56	acidificação (RAFinose)		
XYL	D-xilose	1,4	acidificação (XILose)		
SAC	D-sacarose	1,32	acidificação (SACarose)		
MDG	metil-α-D-glucopiranosido	1,28	acidificação (metil-α-D-Glucopiranosido)	vermelho	amarelo
NAG	N-acetil-glucosamina	1,28	acidificação (N-Acetil-Glucosamina)		
ADH	L-arginina	1,904	Arginina DiHidrolase	amarelo	laranja-vermelho
URE	Ureia	0,76	UREase	jaune	vermelho-violeta

Os testes de acidificação devem ser lidos por comparação com os testemunhos negativo (0) e positivo (GLU).

* Os testes MNE e XLT podem ser laranjas, quando cercados ou precedidos por testes positivos. Devem então ser considerados negativos.

- As quantidades indicadas podem ser ajustadas em função dos títulos das matérias primas.
- Algumas cúpulas contêm componentes de origem animal, nomeadamente peptonas.

PROCEDIMENTO
QUADRO DE IDENTIFICAÇÃO
BIBLIOGRAFIA
QUADRO DE SÍMBOLOS

p. I
p. II
p. III
p. IV

A bioMérieux, o logotipo azul, API e ap[®] são marcas utilizadas, depositadas e/ou registadas, propriedade exclusiva da bioMérieux SA ou de uma das suas filiais.

ATCC é uma marca, propriedade exclusiva da American Type Culture Collection.

As outras marcas e nomes de produtos mencionados neste documento são marcas comerciais dos respectivos proprietários.

Brasil: Distribuído por bioMérieux Brasil, S.A. - Estrada do Mapuê, 491 - Jacarepaguá - R.J. - CEP 22710-261

CNPJ 33.040.635/0001-71

Atendimento ao Consumidor Tel.: 0800-264848

Prazo de Validade, N° de Lote, N° de Registro de Ministério da Saúde e Responsável Técnico:
VIDE EMBALAGEM



bioMérieux SA
RCS LYON 673 620 399
69280 Marcy l'Etoile / France
Tél. 33 (0)4 78 87 20 00
Fax 33 (0)4 78 87 20 90
www.biomerieux.com

bioMérieux, Inc
Box 15069,
Durham, NC 27704-0969 / USA
Tél. (1) 919 620 20 00
Fax (1) 919 620 22 11
Impresso em França



Anexo IV – Protocolo do Teste de *screening* em meio de oxacilina

- Identificar os meios de cultura com a data em que foi realizado o ensaio e com o Cód. ID do aluno;
- Preparar a suspensão bacteriana, sendo que no final o inóculo deve conter 0.5 McF;
- Inocular a gelose de Mueller-Hinton com oxacilina a 6µg/ml;
- Incubar a 30 °C durante 24 horas;
- Analisar a placa, pesquisando qualquer colónia que tenha crescido.

Anexo V – Protocolo de Extração: RTP[®] Bacteria DNA Mini Kit

A. Bactéria Gram – positiva:

- Adicionar 400 µl **Resuspension Buffer R** à colónia isolada e resuspender com a pipeta;
 - Transferir a amostra para **Extraction Tube L** e levar ao vórtex;
 - Incubar a 10 minutos a 37 °C. Depois com a amostra na placa, incubar a 65 °C durante 10 minutos;
- B. Colocar **Extraction Tube L** na placa e incubar a 95 °C, durante 5 – 10 minutos;
- C. Adicionar 400 µl **Binding Buffer B6** e ir ao vórtex;
- D. Colocar a amostra **RTA Spin Filter Set** e vai a incubar 1 minuto. Centrifugar 12.000 rpm, durante 1 min. Descartar o filtrado e reposicionar para o **Receiver Tube**;
- E. Adicionar 500 µl **Wash Buffer I** e centrifugar a 10.000 rpm, durante 1 minuto. Descartar o filtrado e reposicionar para o **Receiver Tube**;
- F. Adicionar 600 µl **Wash Buffer II** e centrifugar a 10.000 rpm, durante 1 minuto. Centrifugar 3 x à máxima velocidade para eliminar o etanol;
- G. Colocar **RTA Spin Filter Set** em um novo 1.5 ml **Receiver Tube** e adicionar 200 µl de **Elution Buffer D**. Incubar à temperatura ambiente. Centrifugar a 8.000 rpm, durante 1 minuto.



Anexo VI – Protocolo de Electroforese em gel de Agarose a 1%

Procedimento:

1. Preparação do tampão de electroforese TAE 1x (stock de tampão TAE 50x concentrado): Para 1L adicionar 20 ml de TAE 50x e 980 ml de água destilada.
2. Preparação do suporte do gel:
Colocar fita-cola nas extremidades do suporte e posicionar o pente
3. Preparação da Agarose:
 - a) Pesar 1,5 g de agarose;
 - b) Colocar num erlenmeyer grande e adicionar 150 ml de TAE 1X;
 - c) Dissolver a agarose no micro-ondas (programar para ~2min, tendo o cuidado de parar o programa a meio para homogeneizar a solução. Caso a solução não esteja totalmente translúcida voltar a colocar mais 1 min no micro-ondas). Quando totalmente dissolvida, deixar arrefecer um pouco;
 - d) Adicionar *gel red* e homogeneizar.
4. Verter no suporte com o pente já posicionado corretamente.
5. Deixar solidificar.
6. Preparação das amostras a aplicar. Do marcador aplicar entre 1 e 2 µl, apenas, num dos poços do gel (início por exemplo). Se for incolor adicionar, antes da aplicação, o tampão de amostra.
7. Retirar o pente com cuidado.
8. Colocar o suporte com o gel dentro da tina de electroforese.
9. Colocar o tampão de electroforese na tina até cobrir totalmente o gel.
10. Aplicar as amostras.
11. Electroforese a 90 volts.

Anexo VII – Protocolo de Determinação da CMI para a vancomicina

- Identificar 9 tubos contendo 1 ml de Mueller-Hinton (e.g. tubo 1 ou tubo com 4 mg/l de vancomicina);
- Partindo de uma solução de vancomicina de 16µg/ml em Mueller-Hinton, retirar 1 ml para o 1º tubo e homogeneizar bem;
- Do 1º tubo retirar 1 ml de solução e transferir para o 2º tubo, homogeneizando bem;
- Continuar o passo c) até ao 8º tubo. O 9º tubo não levará antibiótico e servirá, portanto, como controlo de crescimento;
- Preparar uma suspensão bacteriana equivalente a 0.5 McF num tubo contendo SFE;
- Transferir 0.5 ml (500 µl) da suspensão referida em e) para todos os tubos, exceto para o 8º tubo (controlo de esterilidade)
- Incubar a 37 °C durante 24 horas;
- Inocular uma gelose de sangue para controlo de pureza;
- Passadas as 24 horas, analisar os resultados, sendo a CMI correspondente ao primeiro tubo em que não se verifique crescimento bacteriano

